

**Identifizierung der Wirkmechanismen von mikrobiellen
Antagonisten von *Erwinia amylovora***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Silvia Schmoock
geboren am 27.02.1979 in Hamburg

2010

Referent: PD Dr. Achim Gau

Korreferent: Prof. Dr. Edgar Maiss

Tag der Promotion: 30.06.2010

*Für meinen Großvater Ludwig Reher, der mich das Lachen des
Grünspechts gelehrt hat.*

Zusammenfassung

Die Infektion insbesondere von Apfel- und Birnenbäumen mit dem Bakterium *Erwinia amylovora* führt zu der Krankheit Feuerbrand, einer der schwerwiegendsten Erkrankungen im Erwerbsobstbau.

Eine ausreichende Feuerbrand-Kontrolle erfordert meistens den Einsatz von Antibiotika wie Streptomycin oder Oxytetracyclin. Aufgrund von Rückstandproblematiken und Entwicklungen Streptomycin-resistenter *E. amylovora*-Stämme besteht großes Interesse in alternativen Behandlungsmethoden, beispielsweise durch Applikation nicht-pathogener Feuerbrandantagonisten in die Phyllosphäre.

Für eine effektive Wirksamkeit der Antagonisten sind Kenntnisse über die Art ihrer Wirkmechanismen von großer Wichtigkeit. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung der Wirkmechanismen der mykotischen Antagonisten *Aureobasidium pullulans* CF10 und CF40, sowie der bakteriellen Antagonisten *Pseudomonas fluorescens* A506 und Bk3. Zur Evaluierung inhibitorischer Wirkweisen wurde der biolumineszente Stamm *E. amylovora* 222::TnluxCDABE verwendet, und die Biolumineszenz desselben in Gegenwart der Antagonisten sowie der von ihnen sekretierten extrazellulären zellfreien Komponenten mittels hoch-sensitiver CCD-Kameras gemessen.

Für *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 konnte gezeigt werden, dass nur auf ungepuffertem Kulturaragar eine starke Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden konnte. Da die Hefen zudem Kulturmedien ansäuern können, aber nachweislich keine extrazellulären inhibitorischen Komponenten sekretieren, ist ihr Wirkmechanismus vermutlich auf eine Ansäuerung hin zu einem pH zurückzuführen, bei dem der Feuerbranderreger nicht mehr wachsen kann.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 konnten *E. amylovora* 222::TnluxCDABE hingegen nicht nur in direkter Co-Kultur hemmen und zeigten in verschiedenen Kulturmedien ein deutlich schnelleres Wachstumsverhalten als der Feuerbranderreger, sondern sekretieren zusätzlich extrazelluläre hoch- und niedermolekulare Komponenten mit einer stark inhibitorischen Wirkung. Auch wenn mittels Transposon-Mutagenese eine Identifizierung der Gene, die im direkten Zusammenhang mit diesen Komponenten stehen, nicht möglich gewesen ist, so war eine partielle Charakterisierung der niedermolekularen Komponenten erfolgreich. Es wurde gezeigt, dass mit sehr großer Wahrscheinlichkeit das durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 produzierte Siderophor Pyoverdine sowie Salizylsäure unter *in vitro* Bedingungen eine stark inhibitorische Wirkung auf den biolumineszenten Feuerbranderreger haben.

Diese Komponenten könnten ein großes Potential für die Entwicklung neuer Mittel zur Bekämpfung des Feuerbranders auch im Freiland haben: Die Applikation der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 und Bk3 auf Apfelblüten führte zu symptomfreien Pflanzen nach künstlicher Infektion mit *E. amylovora* 222.

Schlagwörter: Antagonist – Feuerbrand – Inhibierung

Abstract

Fire blight caused by the bacterium *Erwinia amylovora* is one of the most devastating diseases in commercial apple and pear orchards.

An efficient fire blight control mostly requires application of antibiotics like streptomycin or oxytetracycline. Due to problems caused by antibiotic residues in the environment or development of streptomycin-resistant *E. amylovora* strains, a great interest exists in alternative methods of treatment, for example application of non-pathogenic fire blight antagonists to the phyllosphere.

For an effective deployment of the antagonists in disease management, knowledge about their modes of action is of great importance. Therefore, it was aimed to identify the modes of action of the yeast antagonists *Aureobasidium pullulans* CF10 and CF40, as well as the bacterial antagonists *Pseudomonas fluorescens* A506 and Bk3. For evaluation of inhibitory effects the bioluminescent strain *E. amylovora* 222::TnluxCDABE was used, and bioluminescence was measured by ultra-sensitive CCD-cameras in presence of the antagonists or their secreted cell-free extracellular compounds.

For *A. pullulans* CF10 and CF40, a strong inhibition of *E. amylovora* 222::TnluxCDABE could be observed on unbuffered agarplates. The inhibition of growth can be explained because the yeasts are able to acidify culture medium. Demonstrably no secretion of extracellular inhibitory compounds was shown, so their supposed mode of action is ascribed to acidification to a pH where the fire blight pathogen is not able to grow.

P. fluorescens A506 and Bk3 were able to inhibit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in co-culture and showed an enhanced growth in different culture media in comparison to the fire blight pathogen. Additionally these antagonists also produce extracellular high- and low-molecular substances with a strong inhibitory effect to *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. The identification of genes, which gene products are directly related with the observed inhibition, was not possible by transposon-mutagenesis. In contrast, a partial characterization of the low-molecular compounds was successful. With major likelihood, it was shown that *P. fluorescens* A506 and Bk3 produce the siderophore pyoverdine and salicylic acid, which have a strong inhibitory effect against the bioluminescent fire blight pathogen *in vitro*.

These compounds might have a great potential for development of new agents combating fire blight under field conditions: Application of the low molecular weight fraction of the growth supernatants of *P. fluorescens* A506 and Bk3 to apple blossoms led to symptom-free plants after artificial infection with *E. amylovora* 222.

keywords: antagonist – fire blight – inhibition

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| | Zusammenfassung | I |
| | Abstract | II |
| | Inhaltverzeichnis | III |
| | Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | IV |
| | Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Verbreitung und Bedeutung von Feuerbrand | 1 |
| 1.2 | Feuerbrandsymptomatik | 2 |
| 1.3 | Infektionszyklus von Feuerbrand | 3 |
| 1.4 | Pathogenitätsfaktoren von <i>E. amylovora</i> | 5 |
| 1.5 | Kontrolle von Feuerbrand | 6 |
| 1.5.1 | Mechanische Kontrolle | 6 |
| 1.5.2 | Kontrolle Feuerbrand-übertragender Insekten | 6 |
| 1.5.3 | Vorhersagemodelle | 7 |
| 1.5.4 | Einsatz von Antibiotika und anderer chemischer Komponenten | 7 |
| 1.5.5 | Züchtung und Einsatz Feuerbrand-resistenter <i>Malus domestica</i> Kultivare | 9 |
| 1.6 | Biologische Kontrolle von Feuerbrand | 10 |
| 1.6.1 | Biologische Kontrolle von Phytopathogenen durch Antagonisten | 10 |
| 1.6.2 | <i>Pseudomonas</i> -Stämme als Antagonisten und Beschreibung von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 12 |
| 1.6.3 | <i>A. pullulans</i> -Stämme als Antagonisten und Beschreibung von <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 | 14 |
| 1.7 | Visualisierung von <i>E. amylovora</i> durch Markierung der Bakterien mit Luziferase-Reportergenen | 15 |
| 1.8 | Ziele dieser Promotionsarbeit | 18 |
| 2. | Material und Methoden | 19 |
| 2.1 | Kulturmedien | 19 |
| 2.2 | Kulturagar | 20 |
| 2.3 | Verwendete Bakterienstämme und Plasmide | 22 |
| 2.4 | Verwendete DNA-Marker | 24 |
| 2.5 | Verwendete Proteinmarker | 25 |
| 2.6 | Transformation von <i>E. coli</i> , <i>P. fluorescens</i> und <i>E. amylovora</i> | 25 |
| 2.6.1 | Herstellung elektrokompetenter Zellen | 26 |

| | | |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6.2 | Transformation von elektrokompententen <i>E. coli</i> S17-1 $\alpha\lambda$ -pir, <i>E. coli</i> DH5 α λ -pir, <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 und <i>E. amylovora</i> 222 | 26 |
| 2.7 | Biolumineszenzmessung mit der CCD-Kamera | 27 |
| 2.8 | Dual Culture Tests | 28 |
| 2.8.1 | Bestimmung der Zellzahl von Bakterien- und Hefekulturen | 29 |
| 2.8.2 | Prinzip von Dual Culture Tests mit <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE und den eingesetzten Antagonisten | 30 |
| 2.9 | Erstellung des Vektors pUT | 30 |
| 2.9.1 | <i>NotI</i> -Spaltung von pUTgfpluxAB | 30 |
| 2.9.2 | Aufreinigung von pUT aus einem Agarosegel | 31 |
| 2.9.3 | Religation von pUT | 31 |
| 2.10 | Mutagenese von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 32 |
| 2.10.1 | Mutagenese von <i>P. fluorescens</i> A506 via Transformation mit pUT | 32 |
| 2.10.2 | Mutagenese von <i>P. fluorescens</i> Bk3 via Konjugation mit <i>E. coli</i> DH5 α -pir pRL27 | 33 |
| 2.10.3 | Screening der Mutanten auf eine reduzierte inhibitorische Wirkung gegenüber <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE | 34 |
| 2.11 | Detektion des Integrationsortes des Tn5-Transposons bei den <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3- Mutanten | 34 |
| 2.11.1 | Detektion des Integrationsortes des Transposons bei <i>P. fluorescens</i> A506-Mutanten | 35 |
| 2.11.2 | Detektion des Integrationsortes des Transposons bei <i>P. fluorescens</i> Bk3-Mutanten | 37 |
| 2.12 | Isolierung von Plasmiden aus Bakterien | 38 |
| 2.12.1 | Isolierung von Plasmid-DNA über alkalische Lyse | 39 |
| 2.12.2 | Aufreinigung von Plasmiden mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit von Fermentas | 40 |
| 2.13 | Isolierung von genomischer DNA aus den <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3-Mutanten | 40 |
| 2.13.1 | Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>P. fluorescens</i> A506 | 40 |
| 2.13.2 | Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>P. fluorescens</i> Bk3 mit dem peqGOLD Bacterial DNA Kit von Peqlab | 42 |
| 2.14 | Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren mit der TrayCell | 42 |
| 2.15 | Aufreinigung gespaltener genomischer DNA mit dem peqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kit von Peqlab | 43 |
| 2.16 | Gelelektrophorese von Nukleinsäuren | 43 |
| 2.17 | Aufnahme von Wachstumskurven | 44 |
| 2.17.1 | Aufnahme von Wachstumskurven mit den Wildtypen und Mutanten von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3, sowie von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE | 45 |

| | | |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.17.2 | Aufnahme von Wachstumskurven mit gleichzeitiger Biolumineszenzmessung | 46 |
| 2.18 | Herstellung von Wachstumsüberständen | 46 |
| 2.19 | Isolierung von Periplasma | 48 |
| 2.20 | Bradford-Proteinbestimmung | 49 |
| 2.21 | 1D und 2D-Gelelektrophorese und Färbemethoden für Proteingele | 50 |
| 2.21.1 | Isoelektrische Fokussierung | 50 |
| 2.21.2 | Tris-Tricin Gelelektrophorese | 51 |
| 2.21.3 | Coomassie-Färbung | 53 |
| 2.21.4 | Coomassie-Colloidal-Färbung | 53 |
| 2.21.5 | Silberfärbung | 54 |
| 2.22 | Vorinkubation von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE mit Fraktionen von Wachstumsüberständen oder Periplasma der ausgewählten Antagonisten | 55 |
| 2.23 | Hemmhoftests | 56 |
| 2.23.1 | Hemmhoftests mit Zellkulturen | 56 |
| 2.23.2 | Hemmhoftests mit Wachstumsüberständen | 57 |
| 2.24 | Gelfiltration | 57 |
| 2.25 | Dünnschichtchromatographie von der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 nach Gelfiltration | 59 |
| 2.26 | Analyse der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 mittels Massenspektrometrie (MS) | 60 |
| 2.27 | Pikrinsäuretest zur Detektion von Cyanwasserstoff (HCN) | 61 |
| 2.28 | Nachweis von 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG), Phenazin-1-Carbonsäure (PCA) und Pyoluteorin (PLT) in der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 61 |
| 2.29 | Biologische Kontrolle von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE durch die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 auf Blüten von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox | 62 |
| 3. | Ergebnisse | 64 |
| 3.1 | Transformation von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 sowie <i>E. amylovora</i> 222 mit Luziferasereporter genen | 64 |
| 3.2 | Dual Culture Tests von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE mit <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 sowie <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 65 |
| 3.2.1 | Dual Culture Test von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE mit <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 auf PDA | 65 |
| 3.2.2 | Dual Culture Test von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE mit <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 auf NBS | 66 |

| | | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.3 | Dual Culture Tests von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE mit <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 auf NBSP | 68 |
| 3.2.4 | Vorbehandlung von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE mit hoch- und niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>A. pullulans</i> CF10 und CF40 | 69 |
| 3.2.5 | Dual Culture Tests von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE mit <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 69 |
| 3.2.6 | Zusammenfassung der Ergebnisse von 3.2.1 bis 3.2.5 | 70 |
| 3.3 | Mutagenese von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 72 |
| 3.3.1 | Erstellung des Vektors pUT | 72 |
| 3.3.2 | Mutagenese und Screening der Mutanten von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 auf eine reduzierte inhibitorische Wirkung gegenüber <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE durch Messung von Biolumineszenz | 73 |
| 3.3.3 | Detektion des Integrationsortes des Transposons bei den <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3-Mutanten | 77 |
| 3.4 | Aufnahme von Wachstumskurven des Wildtyps und der Mutanten von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 sowie <i>E. amylovora</i> 222 | 86 |
| 3.4.1 | Vergleichende Wachstumskurven von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE und dem Wildtyp von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 87 |
| 3.4.2 | Vergleichende Wachstumskurven des Wildtyps und der Mutanten von <i>P. fluorescens</i> A506 | 88 |
| 3.4.3 | Vergleichende Wachstumskurven des Wildtyps und der Mutanten von <i>P. fluorescens</i> Bk3 | 91 |
| 3.4.4 | Wachstumskurven von lumineszenten und nicht-lumineszenten <i>E. amylovora</i> 222 in Gegenwart von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 mit gleichzeitiger Biolumineszenzmessung | 94 |
| 3.5 | Bestimmung der Proteinkonzentration in Wachstumsüberständen und Periplasma mit dem Bradford Assay | 98 |
| 3.6 | Charakterisierung von Wachstumsüberständen und Periplasma von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 (Wildtyp und Mutanten) und Wachstumsüberständen von <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 sowie von <i>E. amylovora</i> 222 mittels 1D und 2D Gelelektrophorese | 100 |
| 3.6.1 | 1D-Gelelektrophorese der Wachstumsüberstände und des Periplasmas von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 sowie der Wachstumsüberstände von <i>A. pullulans</i> CF10 und CF40 | 100 |
| 3.6.2 | Charakterisierung der Wachstumsüberstände von Wildtyp und Mutanten von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 durch 2D-Gelelektrophorese | 103 |
| 3.6.3 | Untersuchung des Einflusses von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE auf die Proteinsekretion von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 durch Analyse der extrazellulären Proteinzusammensetzung mit 2D Gelelektrophorese | 108 |
| 3.7 | Vorinkubationversuche | 112 |

| | | |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.7.1 | Vorbehandlung von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE mit hoch- und niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 112 |
| 3.7.2 | Vorbehandlung der Wachstumsüberstände mit Hitze bzw. pH-Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung | 115 |
| 3.7.3 | Vorinkubation von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE mit hoch- und niedermolekularen Fraktionen des Periplasmas von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 119 |
| 3.8 | Hemmhoftests in Gegenwart von ganzen Zellen oder Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 121 |
| 3.8.1 | Hemmhoftests in Gegenwart von ganzen Zellen | 121 |
| 3.8.2 | Hemmhoftests in Gegenwart von Wachstumsüberständen | 126 |
| 3.9 | Nachweis der Cyanwasserstoff-Produktion durch verschiedene <i>P. fluorescens</i>-Stämme und <i>E. amylovora</i> 222 | 131 |
| 3.10 | Produktion von 2,4- Diacetylphloroglucinol (DAPG), Phenazin-1-Carbonsäure (PCA) und Pyoluteorin (PLT) durch <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3? | 133 |
| 3.11 | Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 135 |
| 3.11.1 | Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 mit Gelfiltration | 135 |
| 3.11.2 | Analyse der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 nach Gelfiltration mittels Dünnschichtchromatographie | 137 |
| 3.11.3 | Massenspektrometrie von Peak 1 und Peak 2 der Gelfiltration von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 145 |
| 3.11.4 | Hemmhoftests in Gegenwart von Fraktionen der Gelfiltration und in Gegenwart von Salizylsäure | 150 |
| 3.12 | Infektion von Blüten von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox mit <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE nach Vorbehandlung mit der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 154 |
| 4. | Diskussion | 156 |
| 4.1 | Transformation von <i>P. fluorescens</i> A506 und Bk3 mit pUTgfpluxAB bzw. pRL1406 mit <i>E. amylovora</i> 222 zur Erstellung von biolumineszenten bzw. autobiolumineszenten Zellen | 156 |
| 4.2 | Charakterisierung der inhibitorischen Wirksamkeit von <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 auf <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE | 157 |
| 4.3 | Beurteilung der direkten inhibitorischen Wirksamkeit von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 auf <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE | 159 |
| 4.4 | Mutagenese von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 mit dem Vektor pUT und Charakterisierung der Mutanten | 162 |

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.4.1 | Screening und Charakterisierung der generierten Mutanten in Dual Culture- und Hemmhoftests | 162 |
| 4.4.2 | Charakterisierung der generierten Mutanten durch Aufnahme von Wachstumskurven und Analyse der extrazellulären Proteinfraction | 163 |
| 4.4.3 | Schlussbetrachtung der Mutagenese und der Charakterisierung der Mutanten | 166 |
| 4.5 | Wechselwirkungen zwischen <i>P. fluorescens</i> A506 und Bk3 sowie <i>E. amylovora</i> 222 | 167 |
| 4.6 | Charakterisierung der hochmolekularen Fraktion (> 5 kDa) der Wachstumsüberstände und des Periplasmas von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 171 |
| 4.7 | Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion (< 5 kDa) der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 175 |
| 4.8 | Zusammenfassung der Ergebnisse zur hoch- und niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 und Bk3 | 183 |
| 4.9 | Zusammenfassung und Ausblick | 183 |
| 5. | Literaturverzeichnis | 187 |
| 6. | Anhang | 200 |
| | Erklärung zur Dissertation | 206 |
| | Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge | 207 |
| | Lebenslauf | 208 |
| | Erklärung zum Verbundvorhaben | 209 |
| | Danksagung | 210 |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | | |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abb. 1.1.1 | Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>E. amylovora</i> | 1 |
| Abb. 1.2.1 | Beispiele für Feuerbrandsymptomaten | 3 |
| Abb. 1.3.1 | Infektionszyklus von <i>E. amylovora</i> | 4 |
| Abb. 2.3.1 | pUTgfpluxAB | 23 |
| Abb. 2.3.2 | pBluescript SK Vektorkarte | 24 |
| Abb. 2.4.1 | Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder und λ -DNA <i>Hind</i> III Marker | 24 |
| Abb. 2.5.1 | SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard | 25 |
| Abb. 2.8.1.1 | Schema einer Thoma-Zählkammer | 29 |
| Abb. 3.1.1 | Messung der Biolumineszenz von Transformanten auf LB-Agar | 65 |
| Abb. 3.2.1.1 | Messung der Biolumineszenz bei Co-Kultur von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE und <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 auf PD-Agar | 66 |
| Abb. 3.2.2.1 | Messung der Biolumineszenz bei Co-Kultur von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE und <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 auf NBS-Agar | 67 |
| Abb. 3.2.3.1 | Messung der Biolumineszenz bei Co-Kultur von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE und <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 auf NBSP-Agar | 68 |
| Abb. 3.2.5.1 | Messung der Biolumineszenz bei Co-Kultur von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE und <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 70 |
| Abb. 3.3.1.1 | Konstruktion des Vektors pUT | 72 |
| Abb. 3.3.1.2 | Plasmidpräparation von pUTgfpluxAB und pUT | 73 |
| Abb. 3.3.2.1 | Vorscreening der Insertionsmutanten von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 75 |
| Abb. 3.3.2.2 | Screening der Insertionsmutanten von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 76 |
| Abb. 3.3.3.1 | Gelelektrophorese der genomischen DNA von <i>P. fluorescens</i> A506-Mutanten | 78 |
| Abb. 3.3.3.2 | Gelelektrophorese der aus <i>E. coli</i> DH5 α mcr isolierten, mit <i>Eco</i> RV gespaltenen Plasmide mit Inserts genomischer DNA der <i>P. fluorescens</i> A506-Mutanten | 79 |
| Abb. 3.3.3.3 | Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> DH5 α λ -pir-Transformanten mit Plasmiden aus genomischer DNA der <i>P. fluorescens</i> Bk3-Mutanten | 82 |
| Abb. 3.4.1.1 | Wachstumskurven von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE und <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 in LB-Medium (LB) und M9-Medium | 88 |
| Abb. 3.4.2.1 | Wachstumskurven von <i>P. fluorescens</i> A506, Wildtyp und Mutanten in LB-Medium | 89 |
| Abb. 3.4.2.2 | Wachstumskurven von <i>P. fluorescens</i> A506, Wildtyp und Mutanten in M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin | 89 |
| Abb. 3.4.2.3 | Wachstumskurven von <i>P. fluorescens</i> A506, Wildtyp und Mutanten in M9-Medium mit 10 mM Asparagin | 90 |

| | | |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Abb. 3.4.2.4 | Wachstumskurven von <i>P. fluorescens</i> A506, Wildtyp und Mutanten in M9-Medium mit 0,5% Glukose und 5 mM Nitrat | 91 |
| Abb. 3.4.3.1 | Wachstumskurven von <i>P. fluorescens</i> Bk3, Wildtyp und Mutanten in LB-Medium | 92 |
| Abb. 3.4.3.2 | Wachstumskurven von <i>P. fluorescens</i> Bk3, Wildtyp und Mutanten in M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin | 92 |
| Abb. 3.4.3.3 | Wachstumskurven von <i>P. fluorescens</i> Bk3, Wildtyp und Mutanten in M9-Medium mit 10 mM Asparagin | 93 |
| Abb. 3.4.3.4 | Wachstumskurven von <i>P. fluorescens</i> Bk3, Wildtyp und Mutanten in M9-Medium mit 0,5% Glukose und 5 mM Nitrat | 94 |
| Abb. 3.4.4.1 | Wachstumskurven von <i>E. amylovora</i> 222 und <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE in An- und Abwesenheit von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. <i>P. fluorescens</i> A506::TngfpluxAB | 95 |
| Abb. 3.4.4.2 | Wachstumskurven von <i>E. amylovora</i> 222 und <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE in An- und Abwesenheit von <i>P. fluorescens</i> Bk3 bzw. <i>P. fluorescens</i> Bk3::TngfpluxAB | 96 |
| Abb. 3.4.4.3 | Im zeitlichen Verlauf gemessene Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222[::TnluxCDABE] und <i>P. fluorescens</i> A506[::TngfpluxAB] | 97 |
| Abb. 3.4.4.4 | Im zeitlichen Verlauf gemessene Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222[::TnluxCDABE] und <i>P. fluorescens</i> Bk3[::TngfpluxAB] | 97 |
| Abb. 3.5.1 | Standardreihe für die Proteinbestimmung nach Bradford | 98 |
| Abb. 3.6.1.1 | Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 101 |
| Abb. 3.6.1.2 | Periplasma von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 101 |
| Abb. 3.6.1.3 | Wachstumsüberstände von <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 | 102 |
| Abb. 3.6.2.1 | 2D-Gele der Wachstumsüberstände des Wildtyps von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 103 |
| Abb. 3.6.2.2 | 2D-Gele der Wachstumsüberstände des Wildtyps und der Mutante #8-42 von <i>P. fluorescens</i> A506 | 105 |
| Abb. 3.6.2.3 | 2D-Gele der Wachstumsüberstände des Wildtyps und der Mutanten von <i>P. fluorescens</i> A506 | 106 |
| Abb. 3.6.2.4 | 2D-Gele der Wachstumsüberstände des Wildtyps und der Mutanten von <i>P. fluorescens</i> Bk3 | 107 |
| Abb. 3.6.3.1 | 2D-Gele der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3, angezogen in Abwesenheit oder Anwesenheit von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE und in Gegenwart von 0,5 mM CaCl ₂ | 110 |
| Abb. 3.6.3.2 | 2D-Gele der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3, angezogen in Abwesenheit oder Anwesenheit von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE | 111 |
| Abb. 3.7.1.1 | Messung der Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE nach Vorinkubation mit der hoch- bzw. niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 114 |
| Abb. 3.7.2.1 | Messung der Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE nach Vorinkubation mit der unbehandelten bzw. erhitzten | 115 |

| | | |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| | hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | |
| Abb. 3.7.2.2 | Messung der Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE nach Vorinkubation mit der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3; pH 6-8 | 117 |
| Abb. 3.7.2.3 | Quantifizierung der gemessenen Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE nach Vorinkubation mit der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3; pH 6-8 | 118 |
| Abb. 3.7.3.1 | Messung der Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE nach Vorinkubation mit der hoch- bzw. niedermolekularen Fraktion des Periplasmas von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 120 |
| Abb. 3.8.1.1 | Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE durch <i>P. fluorescens</i> A506 o. Bk3 | 122 |
| Abb. 3.8.1.2 | Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE durch Mutanten von <i>P. fluorescens</i> A506 | 123 |
| Abb. 3.8.1.3 | Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE durch Mutanten von <i>P. fluorescens</i> Bk3 | 124 |
| Abb. 3.8.1.4 | Lichtbilder der Hemmhoftests mit <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 auf Minimalmedium mit und ohne 0,2 mM FeCl ₃ | 125 |
| Abb. 3.8.2.1 | Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE durch hoch- und niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 127 |
| Abb. 3.8.2.2 | Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE durch unbehandelte oder hitzebehandelte hoch- bzw. niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 128 |
| Abb. 3.8.2.3 | Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE durch verdünnte hochmolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 129 |
| Abb. 3.8.2.4 | Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE durch verdünnte niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 130 |
| Abb. 3.8.2.5 | Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit hoch- bzw. niedermolekularen Fraktionen von Wachstumsüberständen von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3, optional angezogen mit 0,2 mM FeCl ₃ | 131 |
| Abb. 3.9.1 | Pikrinsäuretest zum Nachweis von HCN | 132 |
| Abb. 3.10.1 | Nachweis der Produktion von DAPG, PCA und PLT bei <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 134 |

| | | |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Abb. 3.11.1.1 | Chromatogramme der Gelfiltrationen von den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 137 |
| Abb. 3.11.2.1 | DC von Peak 1 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 138 |
| Abb. 3.11.2.2 | DC von Peak 2 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 139 |
| Abb. 3.11.2.3 | DC aus Fraktion 1 und 2 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 140 |
| Abb. 3.11.2.4 | DC der Ethylacetatextraktionen aus den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 142 |
| Abb. 3.11.3.1 | Massenspektren von Peak 1 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 147 |
| Abb. 3.11.3.2 | Massenspektren von Peak 2 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 und Bk3 | 148 |
| Abb. 3.11.3.3 | Massenspektren des Salizylsäurestandards und von Peak 2 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 149 |
| Abb. 3.11.4.1 | Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit Peak 1 und 2 aus der Gelfiltration von den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 150 |
| Abb. 3.11.4.2 | Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit Unterfraktionen von Peak 1 und 2 aus der Gelfiltration von den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | 151 |
| Abb. 3.11.4.3 | Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit unterschiedlichen Salizylsäure-Konzentrationen | 152 |
| Abb. 3.11.4.4 | Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalagar mit unterschiedlichen FeCl ₃ -Konzentrationen | 153 |
| Abb. 3.12.1 | Lichtbilder der Blüten von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox nach Infektion mit 3×10^7 Zellen <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE | 154 |
| Abb. 3.12.2 | Messung der Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE auf Blüten von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox | 155 |
| Tab. 3.2.6.1 | Auswertung der Dual Culture Tests mit je 1×10^7 Zellen <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE und <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 bzw. <i>A. pullulans</i> CF10 bzw. CF40 | 71 |
| Tab. 3.3.2.1 | Auswertung der Dual Culture Tests mit je 1×10^7 Zellen <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE und den <i>P. fluorescens</i> A506- und Bk3-Mutanten sowie dem Wildtyp von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. | 77 |

| | | |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| | Bk3 | |
| Tab. 3.3.3.1 | Ergebnisse des NCBI-Blasts (Blastn) mit den durch das SEQLAB Sequence Laboratories ermittelten Sequenzen der <i>P. fluorescens</i> A506-Mutanten | 80 |
| Tab. 3.3.3.2 | Ergebnisse des NCBI-Blasts (Blastn) mit den durch das SEQLAB Sequence Laboratories ermittelten Sequenzen der <i>P. fluorescens</i> Bk3-Mutanten | 83 |
| Tab. 3.4.1 | Medien zur Aufnahme von Wachstumskurven | 87 |
| Tab. 3.5.1 | Ermittelte Proteinkonzentrationen in der hoch- und niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände bzw. in der hoch- und niedermolekularen Fraktion des Periplasmas | 99 |
| Tab. 3.6.2.1 | Überblick über stärker bzw. schwächer exprimierte Proteine der Mutanten von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 im Verhältnis zum jeweiligen Wildtyp | 105 |
| Tab. 3.6.3.1 | Überblick über stärker bzw. schwächer exprimierte Proteine von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE | 109 |
| Tab. 3.11.1.1 | Retentionszeiten der Peaks aus der Gelfiltration | 136 |
| Tab. 3.11.2.1 | Zusammenfassung und Auswertung der Dünnschichtchromatographien | 144 |
| Tab. 3.11.3.1 | Massenpeaks aus der MS von Peak 1 und Peak 2 aus der Gelfiltration | 146 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1D/2D | eindimensional/zweidimensional |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromol |
| A506 | <i>P. fluorescens</i> A506 |
| Abb. | Abbildung |
| AgNO ₃ | Silbernitrat |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| <i>A. pullulans</i> | <i>Aureobasidium pullulans</i> |
| <i>B. cereus</i> | <i>Bacillus cereus</i> |
| Bk3 | <i>P. fluorescens</i> Bk3 |
| BMELV | Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| <i>B. subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Celsius |
| CA | Kalifornien |
| CaCl ₂ | Kalziumchlorid |
| CBBG | Coomassie-Brillant-Blau |
| CCD | charge-coupled-device |
| CF10 | <i>Aureobasidium pullulans</i> CF10 |
| CF40 | <i>Aureobasidium pullulans</i> CF40 |
| CHAPS | (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) |
| cm | Zentimeter |
| cM | centi morgan |
| cv. | Kultivar |
| D | Durchfluss |
| Da | Dalton |
| DAPG | Diacetylphloroglucinol |
| d.h. | das heißt |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| E.a. | <i>E. amylovora</i> 222 |
| <i>E. amylovora</i> | <i>Erwinia amylovora</i> |
| <i>E. carotovora</i> | <i>Erwinia carotovora</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Echerichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |

| | |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <i>E. herbicola</i> | <i>Erwinia herbicola</i> |
| EPS | Extrazelluläre Polysaccharide |
| eV | Elektronenvolt |
| FDU | fast-digest Unit |
| Fe ³⁺ | Eisen ³⁺ |
| FeCl ₃ | Eisen(III)-chlorid |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| <i>F. oxisporum</i> | <i>Fusarium oxisporum</i> |
| g | Gramm |
| GFP | green fluorescent protein |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HCN | Hydrogencyanid |
| Hepes | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| H ₂ O | Wasser |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| HRP | hypersensitive response proteins |
| IEF | isoelektrische Fokussierung |
| IPG | immobilized pH gradient |
| K | Kontrolle |
| k | Kilo |
| kb | Kilobasenpaare |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| K ₂ HPO ₄ | Dikaliumhydrogenphosphat |
| kV | Kilovolt |
| L | Liter |
| LB | Luria Broth |
| LRR | leucin-rich repeats |
| M | Mol |
| mA | Milliampere |
| MALDI-TOF | matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight |
| max. | maximal |
| <i>M. domestica</i> | <i>Malus domestica</i> |
| mg | Milligramm |
| MG-Agar | Mannitol Glutamat Minimalagar |
| MgCl ₃ | Magnesiumchlorid |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| min. | mindestens |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimol |
| mm ³ | Kubikmillimeter |

| | |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| ms | Millisekunde |
| m/z | Verhältnis Masse zu Ladung |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Na ₂ CO ₃ | Natriumcarbonat |
| NaNO ₃ | Natriumnitrat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| Na ₂ S ₂ O ₃ | Natriumthiosulfat |
| NBS | Nutrient-Broth Saccharose |
| NBSP | Nutrient-Broth Saccharose, gepuffert |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| n.d. | nicht detektierbar |
| ng | Nanogramm |
| NH ₄ Cl | Ammoniumchlorid |
| (NH ₄)SO ₄ | Ammoniumsulfat |
| nm | Nanometer |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OD | optische Dichte |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| <i>P. agglomerans</i> | <i>Pantoea agglomerans</i> |
| <i>P. aphanidermatum</i> | <i>Phytium aphanidermatum</i> |
| pv. | pathovar |
| PCA | Phenazin-1-Carbonsäure |
| <i>P. chlororaphis</i> | <i>Pseudomonas chlororaphis</i> |
| <i>P. communis</i> | <i>Pyrus communis</i> |
| PDA | Potato-Dextrose Agar |
| PDB | Potato-Dextrose Broth |
| PEG | Polyethylenglycol |
| <i>P. fluorescens</i> | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| pH | potentia hydrogenii |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| PLT | Pyoluteorin |
| pMol | pico Mol |
| PR | pathogenesis related protein |
| PRL | Pyrrolnitrin |
| <i>P. tolaasii</i> | <i>Pseudomonas tolaasii</i> |
| RF | Retentionsfaktor |
| RLU | relative light units |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SAR | systemic acquired resistance |

| | |
|-----------------------|-----------------------------------|
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| sec. | Sekunde |
| <i>S. epidermidis</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| spp. | Spezies/Mehrzahl |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Tn | Transposon |
| Tris-Cl | Tris-Chlorid |
| U | Unit |
| u.a. | unter anderem |
| Ü | Überstand |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| <i>V. fischeri</i> | <i>Vibrio fischeri</i> |
| Vh | Elektronenvoltstunden |
| <i>V. inaequalis</i> | <i>Venturia inaequalis</i> |
| v/v | volume per volume |
| WT | Wildtyp |
| w/v | weight per volume |
| <i>X. campestris</i> | <i>Xanthomonas campestris</i> |
| <i>X. oryzae</i> | <i>Xanthomonas oryzae</i> |
| x g | mal Erdbeschleunigung |
| z.B. | zum Beispiel |

1. Einleitung

1.1 Verbreitung und Bedeutung von Feuerbrand

Die Infektion von Spezies der *Pomoideae* wie Apfel- und Birnenbäume (*Malus* und *Pyrus*), Quitte (*Cydonia*), Himbeere (*Rubus*) und zahlreiche anderen Nutz- und Zierpflanzen wie zum Beispiel Feuerdorn-Arten (*Pyracantha*), Hagedorn (*Crataegus*) und Mispeln (*Cotoneaster*) mit dem Bakterium *Erwinia amylovora* führt zur Krankheit Feuerbrand und damit zu einer der schwerwiegendsten Erkrankungen im Erwerbsobstbau (Eastgate, 2000; Oh und Beer, 2005).

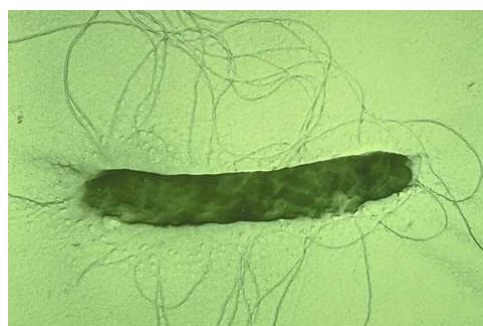


Abb.1.1.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. amylovora* (Johnson 2000)

Feuerbrand ist eine meldepflichtige Krankheit, die erstmalig 1780 in Hudson Valley im Staat New York beobachtet worden ist. Erst 1880 konnte festgelegt werden, dass es sich bei dieser Erkrankung um eine Bakteriose handelt. Bis 1900 hatte sich die Krankheit von ihrem ursprünglichen Entdeckungsort bis nach Ontario, Kanada, Kalifornien, Oregon und Washington ausgebreitet. Bis 1950 wurde Feuerbrand in Japan (1903), Neuseeland (1919), Bermuda (1938) und Mexiko (1943) nachgewiesen. Während der nächsten zehn Jahre breitete sich die Erkrankung weiter östlich aus, wurde 1957 in England erstmalig nachgewiesen und 1964 in Ägypten. Inzwischen hat sich Feuerbrand rapide in zahlreichen weiteren europäischen Ländern ausgebreitet. In Deutschland wurde Feuerbrand erstmalig 1971 in Schleswig-Holstein beobachtet, in Österreich trat die Erkrankung erstmalig 1996 im Vorarlberg auf (van der Zwet, 2002).

E. amylovora verursacht Ernteaufälle, die ökonomisch bedeutsam sind. Bei Befall von Obstplantagen kann es zu Ertragsverlusten zwischen 35% und 100% kommen.

Aus diesem Grund werden in Deutschland durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) seit 2003 jährlich Berichte zur Feuerbrandsituation in Deutschland, aber auch Österreich und der Schweiz zusammengestellt, die Befallsereignisse auflisten und nach Bekämpfungsmöglichkeiten suchen.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Befall von Apfel- und Birnenbäumen seit 2003 nahezu bundesweit beobachtet werden konnte, während die

südlichen Länder witterungsbedingt allgemein stärker betroffen gewesen sind. 2003-2006 waren vergleichsweise befallsarme Jahre, während es 2007 auf Grund anhaltender warmer Witterung zu einem massiven Befall durch Blüteninfektionen, aber auch Sekundärinfektionen der Triebe oder Infektionen von Blättern oder Zweigen bedingt durch Hagelschlag kam. 2008 und 2009 waren zwar witterungsbedingt ungünstiger für Primärinfektionen, da das Infektionspotential auf Grund des starken Vorjahresbefalls aber sehr hoch war, trat auch in diesen Jahren ein stärkerer Befall auf (Bericht über die Feuerbrandsituation, 2003-2009).

Auf Grund von nur eingeschränkten Möglichkeiten bei der Bekämpfung von *E. amylovora* besteht ein großes Interesse an der Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung des Feuerbranderreger. Schwerpunkte des BMELV werden hierbei insbesondere auf eine Bekämpfung von *E. amylovora* ohne Einsatz von Antibiotika gelegt, die zwar am effektivsten wirksam sind, aber auch zur Ausbildung und Verbreitung Antibiotika-resistenter Bakterien führen können.

1.2 Feuerbrandsymptomatik

Feuerbrand verursacht Symptomaten wie Welke, Deformationen und Nekrose befallener Blüten und Blätter, die ein verbrannt-schwarzes Aussehen hinterlassen und namensgebend für die Erkrankung sind.

Ausgehend von Blättern verlaufen Infektionen zumeist entlang der Mittelrippe und der Hauptadern, erkennbar an schwarz-braunen Flecken an den entsprechenden Bereichen (Eastgate, 2000).

Erreicht die Infektion Zweige oder Äste, so verfärbt sich die Rinde schwarz-braun, ist zunächst weich, schrumpft später zusammen und verhärtet sich. Typisch ist ein hakenartiges Einkrümmen von Zweigspitzen. Im späteren Verlauf können sich krebsartige Geschwüre an Ästen, die sogenannten Canker, ausbilden. Canker können ganze Äste einkreisen und zum Absterben derselben oberhalb des Geschwürs führen.

Neben Blüten, Blättern und Zweigen können auch Früchte von der Infektion betroffen werden; auch hier kommt es zu einem Eintrocknen sowie einer braun-schwarzen Verfärbung. Mitunter hängen befallene Früchte noch Monate nach einer Infektion am betroffenen Baum.

Unter feuchten Bedingungen kann an allen befallenen Stellen ein aus Bakterien und Polysacchariden bestehender Schleim (Bakterienexudat) austreten, der zuerst milchig aussieht, sich später aber bräunlich verfärbt (Agrios, 2005; Oh et Beer, 2005).

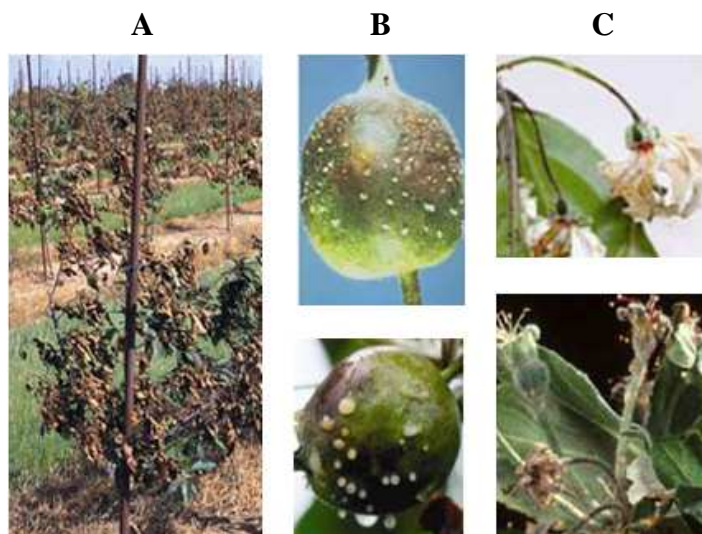


Abb. 1.2.1 Beispiele für Feuerbrandsymptomen. **A** Befallener junger Apfelbaum. **B** Symptomatik an Früchten mit Bakterienexudaten **C** Symptomatik bei Blüteninfektionen. Abbildungen abgeändert nach Norelli et al. (2003) und Oh und Beer (2005).

1.3 Infektionszyklus von Feuerbrand

E. amylovora überwintert in Cankern von Bäumen, die im Vorjahr befallen worden sind. Im Frühjahr werden die Bakterien bedingt durch die Reaktivierung des Pflanzenwachstums wieder aktiv, vermehren sich und dringen in gesundes Holzgewebe ein. Unter geeigneten Witterungsbedingungen (ab 3 Tage mit mehr als 18°C und relativ hoher Luftfeuchtigkeit [$> 75\%$] oder Regen bei gleichzeitiger Blüte der Wirtspflanzen) tritt Bakterienexudat aus Lenticellen und Rissen in der Rinde aus (Agrios, 2005; Ficke und Mäurer, 1990; Schroth et al., 1974).

Durch den zuckerhaltigen Bakterien Schleim werden zahlreiche Insekten angelockt, die den Feuerbranderreger vorwiegend auf Narben von Blüten der Wirtspflanzen als primären Infektionsort verbreiten. Die Bakterien können sich auf der Narbe weiter vermehren, durch Wetterereignisse in den Blütenboden gewaschen werden und über natürliche, nicht-kutinierte Öffnungen der Blüte (Nektarthoden) in das Blütengewebe gelangen.

Neben den Blüten kann *E. amylovora* auch über Verletzungen der Blattoberfläche in Pflanzen eindringen (Agrios, 2005; Eastgate, 2000).

In Geweben von Blüten und Blättern findet eine weitere Vermehrung der Bakterien statt. Durch die Gegenwart des Pathogens im Interzellularraum der Pflanze kommt es zu einer Dysfunktion der Wirts-Zellmembranen und somit zu einer Unterversorgung der Wirtszellen mit Ionen und Nährstoffen und der Symptomentwicklung von Welke und Nekrose.

Ausgehend vom Interzellularraum kann weiteres benachbartes Gewebe befallen werden, die Bakterien aber auch in Gefäße eindringen und die Pflanze systemisch befallen. Eine

Anhäufung der Bakterien im Gefäßsystem führt ebenfalls zu den charakteristischen beschriebenen Welkesymptomen und dem Absterben von Blättern, Früchten und Zweigen, da der Wasserfluss blockiert wird (Eastgate, 2000; Oh et Beer, 2005).

Über befallene Blüten, Blätter, Zweige und Canker kann es auch noch später im Jahr (nach Abschluss der Blütezeit) zu Sekundärinfektionen kommen, die dann auch Früchte betreffen (Norelli et al., 2003).

Zu einer Ausbildung von Cankern kommt es, wenn *E. amylovora* ausgehend vom Rindenparenchym in älteres Gewebe eindringt. Die Wirtspflanze versucht, die Ausbreitung der Infektion durch Ausbildung einer Korkschicht zu stoppen. Die Bakterien können in diesen Cankern entweder überwintern und der Zyklus beginnt im nächsten Jahr erneut, oder aber Bakterienexudat kann wieder durch die Rinde nach außen transportiert werden und als neue Infektionsquelle dienen (Eastgate, 2000).

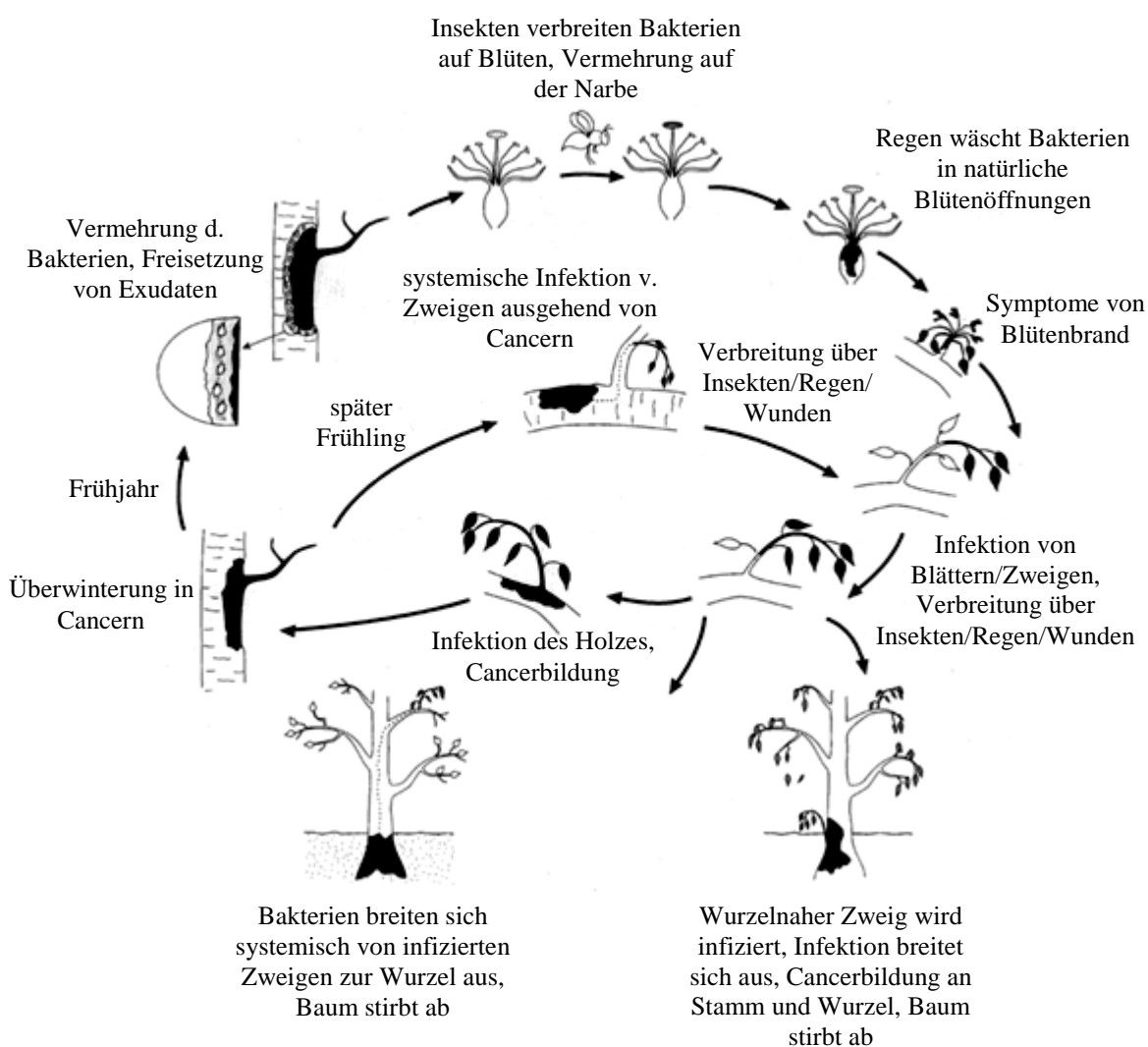


Abb. 1.3.1 Infektionszyklus von *E. amylovora*. Abbildung abgeändert nach Integrated Pest Management <http://www.nysipm.cornell.edu>

1.4 Pathogenitätsfaktoren von *E. amylovora*

Wichtige Pathogenitätsfaktoren von *E. amylovora* sind zum einen extrazelluläre Polysaccharide (EPS), zum anderen „hypersensitive response proteins (HRPs), die eine hypersensitive Reaktion in nicht-Wirtspflanzen auslösen (Eastgate, 2000).

E. amylovora produziert unter anderem die EPS Amylovoran oder Levan. Amylovoran ist ein saures Heteropolysaccharid, das aus Galaktose und Glukuronsäure besteht. Es bildet die Schleimkapsel der Bakterien und ist wesentlicher Bestandteil von aus der Pflanze austretenden Bakterienexudaten. Es wird angenommen, dass Amylovoran zur Maskierung der Bakterien sowie der Speicherung von Wasser und Nährstoffen dient; zudem verursachen EPS bei Anhäufung der Bakterien im Gefäßsystem der Pflanze durch Verstopfung der Gefäße Welkesymptome und den Zusammenbruch von Pflanzengewebe. Amylovoran wird aus Sorbit gebildet, wobei dieser Zuckeralkohol neben Saccharose als Hauptendprodukt aus der Photosynthese von Rosaceen hervorgeht. (Aldridge et al., 1997; Eastgate, 2000; Zhou et al., 2002).

Levan wird durch das Enzym Levansucrase aus einzelnen Fruktose-Molekülen gebildet (Bereswill und Geider, 1997; Bogs und Geider, 2000). *E. amylovora*-Mutanten, die defizient in der Synthese dieser EPS sind, weisen entweder eine reduzierte Pathogenizität auf (Levan-defizient) oder aber sind gänzlich nicht-pathogen (Amylovoran-defizient) (Bereswill und Geider, 1997; Eastgate, 2000).

HRPs liegen kodiert auf einem *hrp* Gen-Cluster und sind assoziiert mit der Induktion einer HR (hypersensitiv response) bei nicht-Wirtspflanzen. Die HR führt bei Infektion der Pflanze durch ein Pathogen über die Erkennung der Infektion zu einem schnellen Tod der Pflanzenzellen am Infektionsort und damit zu einer Verhinderung der Ausbreitung der Pathogene (Eastgate, 2000).

Auf dem *hrp* Gen-Cluster von *E. amylovora* liegen ca. 60 Gene, die sich in 4 verschiedene Regionen einteilen lassen: die *hrp/hrc* sowie die *hrp* Effektor/Elicitor Regionen, die für Komponenten des TypIII-Sekretionssystem kodieren, das pilusartige Strukturen ausbilden und eine direkte Sekretion von Proteinen in die Wirtszelle ermöglichen kann, die *HAE*-Region, die HRP-assoziierte Enzyme kodiert, sowie die „island transfer-region“ (IT). Zwar sekretiert *E. amylovora* keine Zellwand-degradierenden Enzyme, allerdings Proteine wie DspA/E, Hairpins und EopB (Oh und Beer, 2005).

Für das EopB konnte keine Funktion in der Symptomentwicklung festgestellt werden; eine Inaktivierung der Gene von DspA/E oder der Hairpins führen aber zu einem Verlust der Pathogenität des Feuerbranderreger (Boureau et al., 2006; Oh und Beer, 2005).

DspA/E verursacht einen Elektrolyt-Verlust und damit den Zelltod bei der Wirtspflanze; weitere Untersuchungen zeigten, dass das Protein zudem an Rezeptor-ähnliche Serin-/Threonin-Kinasen mit Leucin-reichen Wiederholungen (LRRs) von *Malus domestica* binden

kann. Es wird vermutet, dass hierdurch möglicherweise die Abwehr-Antwort der Wirtspflanze unterdrückt wird.

Die genaue Funktion von Hairpins ist zwar nicht bekannt, es wird aber vermutet, dass wie bei DspA/E Ionenkanäle von Zellen der Wirtspflanze beeinflusst werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Proteine die ATP-Synthese in Tabak blockieren (Boureau et al., 2006; Meng et al., 2006; Oh und Beer, 2005).

1.5 Kontrolle von Feuerbrand

Die Kontrolle von Feuerbrand umfasst verschiedene Maßnahmen. Hierzu gehören die mechanische Bekämpfung mit der Reduktion des Inokulums, die Kontrolle Feuerbrand-verbreitender Insekten, Vorhersagemodelle zur Prognose der Erkrankung, die Anwendung chemischer Mittel wie Antibiotika, der Einsatz resistenter Apfel- oder Birnenkultivare sowie als Alternative die biologische Bekämpfung von Feuerbrand (gesondert aufgeführt unter 1.6).

1.5.1 Mechanische Kontrolle

Im Rahmen der mechanischen Kontrolle werden stark betroffene Bäume gerodet oder befallene Äste großzügig herausgeschnitten. Zur Reduktion des Inokulums ist es besonders wichtig, vor dem nächsten Infektionszyklus (also im Frühjahr vor der Apfel- und Birnenblüte) die Überdauerungsstadien von *E. amylovora* (Canker) aus betroffenen Bäumen herauszuschneiden. Eine besondere Hygiene durch die Desinfektion der Schneidegeräte ist erforderlich (Agrios, 2005; Norelli et al., 2003; Schroth et al., 1974).

Das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) empfiehlt zur mechanischen Kontrolle eine regelmäßige Bestandskontrolle auf einen Feuerbrandbefall, sofortige Riss- und Schnittmaßnahmen bei bestehendem Befall sowie die Verbrennung entfernter Pflanzenbestandteile und die Desinfektion von Schnitt- oder Sägewerkzeugen mit 70% Ethanol oder durch Abflammen (Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008).

1.5.2 Kontrolle Feuerbrand-übertragender Insekten

E. amylovora wird primär für die Infektion von Blüten hauptsächlich durch bestäubende Insekten, in vielen Fällen durch die Honigbiene, verbreitet. Insekten können bis zu 1×10^5 Zellen von *E. amylovora* transportieren und damit auch eine für eine Infektion ausreichende Menge an Bakterien übertragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Übertragung nur weniger Bakterien auf die Blüte einer Wirtspflanze meistens nicht zu einer Vermehrung der Bakterien sowie einer erfolgreichen Infektion ausreicht (Johnson und Stockwell, 1998; Schroth et al., 1974).

Eine Kontrolle Feuerbrand-übertragender Insekten ist nur bedingt möglich. Zwar sollten vor der Blütezeit geeignete Maßnahmen durch Einsatz von Insektiziden ergriffen werden, um die Gefahr der Übertragung zu verringern (Agrios, 2005), dennoch muss berücksichtigt werden, dass Pollen-übertragende Insekten nicht nur den Feuerbranderreger verbreiten, sondern gleichzeitig auch zur Bestäubung der Blüten und damit einer späteren Ernte von Früchten dringend erforderlich sind.

1.5.3 Vorhersagemodelle

Die bekanntesten Feuerbrand-Vorhersagemodelle sind MARYBLYT und COUGARBLIGHT.

MARYBLYT sagt die Gefahr von Blüten- Trieb- und Traumainfektionen (z.B. nach Hagelschlag) voraus, sowie die Gefahr der Cankerentwicklung. Hierbei werden die Temperaturstunden bei 18,3°C aufsummiert. Bei einem Schwellenwert von 110 Stunden bei dieser Temperatur, gleichzeitig vollständig geöffneten intakten Blüten und einer Betauung der Blüten von > 0,25 mm bzw. einem Regenereignis am Vortag von > 2,5 mm ist die Gefahr der Blüteninfektion am größten. Neben der Infektionsgefahr gibt MARYBLYT auch die Gefahr der Symptomentwicklung an (Dewdney et al., 2007; Hartman, 2004; Johnson und Stockwell, 1998).

COUGARBLIGHT summiert ähnlich wie MARYBLYT die Anzahl bestimmter Temperaturstunden, allerdings bei einer Temperatur von 15,5°C über einen Zeitraum von vier Tagen und bildet daraus einen Durchschnittswert. Es werden nur Blüteninfektionen vorhergesagt, wobei zudem die Feuerbrand-Geschichte der Obstplantage aus den Vorjahren berücksichtigt und damit zusätzlich der Inokulum-Druck einbezogen wird. Zusätzlich spielen Blüten-benässende Ereignisse für dieses Vorhersagemodell ebenfalls eine Rolle (Dewdney et al., 2007; Johnson et al., 2004; Johnson und Stockwell, 1998).

1.5.4 Einsatz von Antibiotika und anderer chemischer Komponenten

Die erfolgreichste Bekämpfung von Feuerbrand erfolgt präventiv durch den Einsatz von Streptomycin und Oxytetracyclin. Zwar steht auch ein Ca-Prohexadione-haltiges Pflanzenschutzmittel (Regalis) zur Verfügung, das aber nicht für die Anwendung auf Blüten geeignet ist. Der Wirkstoff blockiert vorübergehend Schritte des Phenylpropanoid-Stoffwechsels. Dadurch entstehen Flavonoide, die für eindringende Pathogene toxisch sind. (Agrios, 2005; Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008).

Auch kupferhaltige Pflanzenschutzmittel können bei präventivem Einsatz gegen Feuerbrand wirksam sein; diese hemmen das Wachstum des Feuerbranderregers vor allem unter Aminosäure-Mangelbedingungen und wirken sich inhibitorisch auf enzymatische Aktivitäten aus, töten *E. amylovora* aber nicht ab. Ein kupferhaltiges Pflanzenschutzmittel gegen

Feuerbrand ist in Deutschland allerdings zurzeit nicht zugelassen (Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008; Geider, 1999).

Streptomycin und Oxytetracyclin werden in den USA bereits seit Mitte des letzten Jahrhunderts gegen *E. amylovora* eingesetzt. Mit steigender Tendenz wurden 2000 beispielsweise ca. 250 g Streptomycin-Formulierung/ha und ca. 175 g Oxytetracyclin-Formulierung/ha für Obstplantagen mit Apfelmulturen appliziert (McManus et al., 2002).

Die Antibiotika können einer Feuerbrand-Infektion um bis zu 90% entgegenwirken, ein großes Problem ist aber das zunehmende Auftreten Streptomycin-resistenter Stämme. Diese wurden bereits im westlichen Nord-Amerika sowie in Michigan, aber beispielsweise auch schon in Israel, Kanada, Neuseeland und im Libanon beobachtet (Johnson und Stockwell, 1998; McManus et al., 2002; Norelli et al., 2003).

Bei Auftreten einer Streptomycin-Resistenz kann alternativ Oxytetracyclin eingesetzt werden, dieses hat im Freiland allerdings eine kürzere Halbwertszeit, ist licht-sensitiv und wirkt nur bakteriostatisch, nicht bakterizid. In Mexiko wird bei Auftreten Streptomycin-resistenter Stämme Gentamycin verwendet, in Israel Oxolinsäure (McManus et al., 2002).

In Deutschland gibt es kein zugelassenes Streptomycin-haltiges Pflanzenschutzmittel, da trotz korrekter Anwendung eine Rückstandproblematik des Antibiotikums in Honig vorliegen kann. Bei „Gefahr im Verzug“ dürfen allerdings Streptomycin-haltige Pflanzenschutzmittel wie „Plantomycin“, „Strepto“ oder „Firewall 17 WP“ mit gesonderter Genehmigung, in begrenztem Umfang und nur über eine Dauer von 120 Tagen angewendet werden. Im ökologischen Landbau ist der Einsatz von Antibiotika schon aus Gründen der Richtlinien nicht gestattet (Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008).

Generell ist der Einsatz Antibiotika-haltiger Pflanzenschutzmittel als problematisch zu werten. Neben in der Umwelt und in Lebensmitteln verbleibenden Rückständen sowie der Gefahr einer Resistenzentwicklung oder Co-Resistenzentwicklung darf auch die direkte Toxizität für den Menschen nicht außer Acht gelassen werden. Vorschriften, die eine bestimmte Schutzkleidung betreffen und Anweisungen, dass behandelte Obstplantagen 12 Stunden lang nicht betreten werden dürfen, müssen eingehalten werden.

Inwiefern Antibiotika-haltige Pflanzenschutzmittel zu einer Resistenzentwicklung bei Humanpathogenen führen können, wird kontrovers diskutiert. Das Spektrum von Antibiotika, die im Freiland gegen Phytopathogene eingesetzt wird, ist sehr begrenzt. Kritik besteht bei der Anwendung aber insofern, dass durch den Einsatz nicht nur Resistenzentwicklungen des Pathogens gegen das entsprechende Antibiotikum möglich sind, sondern durch horizontalen Gentransfer möglicherweise auch mit dieser Resistenz verlinkte Resistenzcluster verbreitet werden können. Diese könnten dann möglicherweise auch auf klinisch bedeutsame Bakterien übertragen werden. In 50-jähriger Verwendung von Antibiotika im Erwerbsobstbau konnte dies bislang aber nicht beobachtet werden (McManus et al., 2002).

1.5.5 Züchtung und Einsatz Feuerbrand-resistenter *M. domestica* Kultivare

Die wirksamste Feuerbrand-Vorbeugung ist der Einsatz von resistenten Apfeln. Diese sind zudem sowohl für den ökologischen Erwerbsobstbau geeignet, als auch für Streuobstplantagen.

Die meisten Apfelsorten, die in Deutschland in Apfelplantagen genutzt werden, sind stark bis sehr stark Feuerbrand-anfällig. Die Züchtung resistenter Sorten wird im Julis-Kühn-Institut in Dresden-Pillnitz und Quedlinburg seit 1974 realisiert und insbesondere seit 2003 intensiviert. Aus den Zuchtprogrammen sind die sogenannten „Re-Sorten“ (u.a. Rebella, Remo, Rewena, Regia, Realka) hervorgegangen, die unter anderem Feuerbrand-resistent sind, aber auf dem Markt eine unzureichende Akzeptanz bezüglich der Lagerfähigkeit der Äpfel sowie ihrem Geschmack haben (Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008).

Die konventionelle Züchtung Feuerbrand-resistenter Sorten ist schwierig, da Obstbäume lange Generationszeiten haben und zudem heterozygot sind. Auch die häufigsten Unterlagen M9 und M26, auf denen die Pflanzen zur Veredelung aufgepfropft werden, sind hochgradig Feuerbrand-anfällig.

Eine Alternative zur konventionellen Züchtung sind gentechnische Methoden wie beispielsweise die *Agrobacterium*-vermittelte Übertragung von Genen in die Pflanze. In die Feuerbrand-anfälligen Kultivare *M. domestica* Royal Gala und Galaxy konnten so Gene für Cecropin und Attacin übertragen werden; diese Proteine wirken sich schädigend auf den Feuerbrand-erreger aus, indem sie die Permeabilität bakterieller Zellmembranen negativ beeinflussen.

Resistente Unterlagen können eine Infektion durch *E. amylovora* zwar nicht verhindern, aber durchaus den Verlust des Baumes durch Wurzelstock-Infektionen (Norelli et al., 2003).

Die gezielte Züchtung resistenter Sorten erfordert meistens das Wissen über Gene, die eine Resistenz verleihen. Resistenzgene gegen *V. inaequalis*, also dem Apfelschorferreger, sind beispielsweise *Vf*, *Vh2*, *Vh4* und *Vbj*; Gene, die eine Resistenz gegenüber Mehltau verleihen, z.B. *Pl1*, *Pld* und *Plw*.

Direkte Resistenz-Gene von Wirtspflanzen gegenüber dem Feuerbrand-erreger sind im Gegensatz zu Pathogenen die Apfelschorf oder Mehltau verursachen bislang nicht bekannt.

Durch Einsatz von Mikrosatelliten-Markern konnten aber sogenannte „Quantitative Trait Loci“ (QTLs) für *E. amylovora* identifiziert werden. Das sind Genbereiche, die in denen verschiedene Gene liegen, die mit der Resistenz gegenüber Feuerbrand assoziiert sind (Kellerhals et al., 2008).

Durch die Kreuzung der Feuerbrand-anfälligen Sorte *M. domestica* Idared mit der resistenten Sorte *Malus* x robusta 5 konnte unter Einsatz von Mikrosatelliten-Markern eine chromosomale Region identifiziert werden, die mit einer Resistenz gegenüber *E. amylovora* assoziiert ist. Die Region umfasst einen Bereich von 15 cM und konnte mit den Markern Hi03d06, CH03g07 und CH03e03 in Verbindung gebracht werden (Peil et al., 2007). Der

Begriff „cM“ ist dabei ein Ausdruck für die Rekombinationshäufigkeit; zwei Loci eines Chromosoms sind dann 1 cM voneinander entfernt, wenn die Rekombinationswahrscheinlichkeit zwischen beiden Loci 1% pro Meiose beträgt. cM ist also keine physikalische Einheit im herkömmlichen Sinn, sondern gibt Wahrscheinlichkeiten an.

In Deutschland werden zur Zeit zwar keine neuen Birnensorten gezüchtet, es besteht aber großer Bedarf bei der Entwicklung weiterer Marker, mit denen Feuerbrand-Resistenzen auf genetischer Ebene detektiert werden können. Auch wenn unter Einsatz gentechnischer Verfahren das Einbringen von Resistenzgenen in Wirtspflanzen theoretisch möglich ist, muss berücksichtigt werden, dass diese Pflanzen eine schlechtere Akzeptanz haben und für den ökologischen Landbau nicht zugelassen sind. Aus diesem Grund darf die traditionelle Obstbaumzüchtung nicht vernachlässigt werden (Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008).

1.6 Biologische Kontrolle von Feuerbrand

1.6.1 Biologische Kontrolle von Phytopathogenen durch Antagonisten

Antagonisten sind Gegenspieler, die in der Lage sind, Pathogene zu unterdrücken oder abzutöten, ohne selber auf den jeweiligen Wirtsorganismen zu einer Krankheitssymptomatik zu führen.

Die biologische Kontrolle von Phytopathogenen umfasst Interaktionen zwischen den eingesetzten Antagonisten und den jeweiligen Krankheitserregern, aber auch die Interaktion zwischen Wirtspflanze und Pathogen sowie Wirtspflanze und Antagonist. Diese Interaktionen beschreiben also sehr komplexe Prozesse, die bis heute nur teilweise verstanden sind und nähere Kenntnisse erforderlich machen.

Dennoch besteht an dieser Form der Bekämpfung ein großes Interesse, da chemische Pflanzenschutzmittel keine hohe Akzeptanz durch den Verbraucher genießen und auf Grund von Resistenzentwicklungen gegen chemische Mittel Alternativen zur Bekämpfung von Phytopathogenen erforderlich sind (Handelsman und Stab, 1996; Whipps, 2001).

Allgemein gesehen müssen geeignete Antagonisten dabei nicht nur in der Lage sein, die Infektion von Wirtspflanzen durch Pathogene zu unterdrücken und Krankheitssymptomentwicklungen zu verhindern, sondern auch Umweltbedingungen wie Mangel an Nährstoffen, UV-Licht, niedrige Temperaturen und Klimaveränderungen tolerieren (Leibinger et al., 1997).

Eine direkte Inhibierung von Phytopathogenen durch den Antagonisten ist auf unterschiedliche Wirkmechanismen zurückzuführen.

Viele Antagonisten produzieren antibiotische Substanzen, die insbesondere bei fluoreszierenden Pseudomonaden gut charakterisiert sind (siehe 1.6.2); aber auch durch andere Bakterienstämme wie *Bacillus* ssp. kann die Freisetzung von antibakteriellen Substanzen wie beispielsweise Cerein erfolgen. Ebenso sind unter pilzlichen Antagonisten Spezies wie *Trichoderma* und *Gliocladium* bekannt, die antibiotische Substanzen wie Gliovirin und Gliotoxin produzieren (Bizani et al., 2005; Handelsman und Stab, 1996).

Neben der Produktion von Antibiotika kann die Freisetzung lytisch wirksamer Enzyme bei antagonistischen Prozessen ebenfalls eine Rolle spielen. Diese Enzyme zersetzen die Zellwand des Pathogens und verhindern so seine Ausbreitung. Lytische Enzyme sind sowohl bei pilzlichen als auch bei bakteriellen Antagonisten zu finden; als Beispiele soll hier die Freisetzung von Glukanasen und Chitinasen bei der Interaktion zwischen *Arthrobacter* und *Phytium* bzw. die Sekretion von Chitinasen durch *B. cereus* bzw. *Pantoea agglomerans* bei der Kontrolle von *Rhizoctonia solani* genannt werden (Whipps, 2001).

Häufig ist auch die Konkurrenz um Eisen Bestandteil der Kontrolle von Pathogenen durch Antagonisten. Eisen liegt in der Umwelt eher in sehr geringer Konzentration vor, so dass viele Bakterien niedermolekulare Verbindungen sekretieren, die Eisenionen binden und dann aktiv von der Zelle aufgenommen werden können. Hierbei handelt es sich um sogenannte Siderophore, die für *P. fluorescens*-Stämme besonders gut untersucht sind. Auf die Freisetzung von Siderophoren wird unter 1.6.2 ausführlicher eingegangen (Handelsman und Stab, 1996).

Neben der Sekretion von Komponenten durch Antagonisten, die sich direkt und indirekt inhibitorisch auf die Phytopathogene auswirken, können Antagonisten zusätzlich in Wechselwirkung mit den Wirtspflanzen treten und hier eine Resistenz-Induktion auslösen.

In Gegenwart des Antagonisten kommt es dabei zu einer Veränderung in der Expression verschiedener Gene, was zu einer höheren Toleranz der Pflanze gegenüber Pathogenen führt.

Diese „systemic acquired resistance“ (SAR) kann in Gegenwart der Antagonisten beobachtet werden, interessanterweise werden aber im Rahmen dieser Reaktion ähnliche Gene für Proteine aktiviert, die auch in Gegenwart von Phytopathogenen produziert werden.

Solches konnte beispielsweise für *M. domestica* cv. Elstar gezeigt werden. Nach Infektion mit dem Apfelschorferreger *Venturia inaequalis* konnte eine Induktion der SAR und mit ihr die Expression der PRs (pathogenesis related proteins) beobachtet werden. In dem ebenfalls pathogen-suszeptiblen cv. Holsteiner Cox konnte durch die Gegenwart des Antagonisten *P. fluorescens* Bk3 ebenfalls die Induktion von SAR und die Produktion von PRs gezeigt werden, wobei der Antagonist aber zu keinerlei Krankheitssymptomen führte (Gau et al., 2004; Kürçüoğlu et al., 2004).

Zu den PRs gehören beispielsweise Chitinasen oder Glukanasen, die pilzliche Zellwände degradieren können, aber auch Endoproteinasen, Peroxidasen oder Enzyme, die

Nukleinsäuren abbauen und damit auch bakterielle Pathogene angreifen. Insgesamt werden die PRs in 14 Familien eingeteilt (Buchanan et al., 2002; Handelsman und Stab, 1996).

Für *E. amylovora*-Stämme konnten bereits zahlreiche Antagonisten identifiziert werden, die unter *in vitro*-Bedingungen zumeist eine gute Kontrolle des Feuerbranderregers zeigten, während unter *in vivo*-Bedingungen häufig keine mit dem Einsatz von Streptomycin vergleichbare Kontrolle erreicht wurde. Studien zeigten, dass durch Einsatz von Antagonisten theoretisch eine Reduktion der Feuerbrandsymptome zwischen 50-80% möglich ist (Johnson und Stockwell, 1998).

Pseudomonas fluorescens- und *Aureobasidium pullulans*-Stämme, die zur Kontrolle von Feuerbrand eingesetzt werden, werden im nachfolgenden Kapitel näher beschrieben. Neben diesen Stämmen konnten bereits *Bacillus* und *P. agglomerans*-Stämme als Antagonisten von *E. amylovora* beschrieben werden, die unter Freilandbedingungen eine Befallsminderung durch den Feuerbranderreger zwischen 43-76% bewirken konnten. In Deutschland ist das Pflanzenschutzmittel Serenade, das den Stamm *B. subtilis* QST 713 beinhaltet, zugelassen. Es ist für den ökologischen Landbau zur Befallsverminderung geeignet (Broggini et al., 2005; Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008; Johnson und Stockwell, 1998; Özaktan und Borer, 2004).

1.6.2 *Pseudomonas*-Stämme als Antagonisten und Beschreibung von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Für verschiedene *P. fluorescens*-Stämme konnten bislang inhibitorische Wirksamkeiten gegenüber Phytopathogenen festgestellt werden.

Bakterien, die zu der Gattung *Pseudomonas* gehören, sind gerade oder gekrümmte Stäbchen mit einer Länge bis zu 4 µm. Sie sind gramnegativ, haben polare Geißeln (einzeln oder multipel), einen respiratorischen Stoffwechsel ohne Gärung und sie können organische Verbindungen mit geringer Molekülmasse metabolisieren.

Die meisten *P. fluorescens*-Stämme produzieren wasserlösliche, gelbgrün-fluoreszierende Pigmente; hierbei handelt es sich um Pyoverdine, die zur Gruppe der Siderophore gehören. Siderophore sind niedermolekulare Verbindungen, mit denen die Bakterien Eisen aus der Umgebung binden und so ihrem Stoffwechsel zur Verfügung stellen können (Madigan und Martinko, 2009). Neben Pyoverdin als Siderophor wurden auch Pyocheline (Salizylsäure-Derivate, bei deren Biosynthese Salizylsäure als Nebenprodukt anfällt), Pseudomonine, Yersiniabactine, Pyridine-2,6-bis(Monothiocarboxylsäure) und Quinolobactine für Pseudomonaden nachgewiesen. Für jedes Siderophor liegt ein Organismus-spezifischer Rezeptor vor, so dass in der Regel nur Bakterien derselben Art Eisenionen, die von ihren spezifischen Siderophoren gebunden worden sind, anschließend auch aufnehmen können.

Gemeinsam ist allen Siderophoren, dass sie unter Eisenmangelbedingungen verstärkt exprimiert werden, während die Gegenwart von Eisen zu einer Suppression ihrer Synthese

führt (Joyner und Lindow, 2000; Meyer und Stinzi, 1998; Rachid und Ahmed, 2005; Varma und Chincholkar, 2007).

Zudem wird vermutet, dass die Sekretion von Siderophoren durch *Pseudomonaden* mit in die Suppression von Phytopathogenen durch die Konkurrenz um Eisen involviert ist. Verschiedene Arbeiten konnten bislang zeigen, dass antagonistische Effekte nur dann auftraten, wenn Siderophore durch die Antagonisten produziert werden, aber in Gegenwart von Eisenionen diese Inhibierung wegfällt (z.B. Helmy et al., 2008; Henry et al., 1991).

Neben Siderophoren produzieren *Pseudomonas*-Stämme verschiedene andere Metabolite, so beispielsweise Cyanwasserstoff oder antibiotische Verbindungen wie 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG), Phenazin-1-Carbonsäure (PCA), Pyrrolnitrin (PRL) und Pyoluteorin (PLT), deren Zusammenhang mit der Suppression verschiedener Phytopathogene auch bereits hergestellt werden konnte (u.a. Haas und Défago 2005; Kavitha et al., 2005; Maurhofer et al., 1994; Velusamy und Gnanamanickam, 2003).

Die Unterdrückung des Feuerbranderregers durch die zuvor genannten durch *P. fluorescens*-Stämme sekretierten oder freigesetzten Verbindungen ist bislang nicht beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit soll unter anderem überprüft werden, inwieweit diese Komponenten bei der Suppression des Stammes *E. amylovora* 222 durch *P. fluorescens* A506 und Bk3 eine Rolle spielen.

Der *P. fluorescens* Stamm A506 wird in den USA unter dem Namen Blight Ban® A506 kommerziell zur Bekämpfung des Feuerbranderregers eingesetzt. Ursprünglich wurde dieses Bakterium von einem gesunden Birnenbaum in einer Obstplantage in der Nähe von Healdsburg, CA isoliert. Der Antagonist kann bei geeigneter Applikation die Feuerbrand-Symptomatik um bis zu 80% verhindern. In früheren Arbeiten wurde zunächst davon ausgegangen, dass *P. fluorescens* A506 ausschließlich über eine Wachstumskonkurrenz zur Unterdrückung von *E. amylovora* führt (Johnson und Stockwell, 1998), neuere Studien zeigten aber auf, dass der Antagonist unter Eisen-supplementierenden Bedingungen möglicherweise ein Antibiotikum produziert, dass sich toxisch auf den Feuerbranderreger auswirkt (Temple et al., 2004).

Um eine ausreichende Wirksamkeit von *P. fluorescens* A506 gegenüber *E. amylovora* gewährleisten zu können, ist es wichtig, dass der Antagonist sich auf den Wirtspflanzen bereits etabliert hat, bevor eine Infektion mit Feuerbrand auftritt. Bei gleichzeitiger Applikation von Antagonist und Pathogen kann keine Kontrolle beobachtet werden, während bei einer ausreichenden Besiedlung durch Vorbehandlung der Blüten mit *P. fluorescens* A506 zwei Tage vor Infektion (zum Infektionszeitpunkt sollten ca. 1×10^6 Zellen des Antagonisten/Blüte vorliegen) die Ausbreitung des Feuerbranderregers signifikant unterdrückt werden kann.

Problematisch dabei ist, dass die Blüte bei Apfel- und Birnenbäumen asynchron verläuft. Die beste Besiedelung durch *P. fluorescens* A506 im Freiland kann beobachtet werden, wenn die

Blüten sich gerade erst öffnen; dies macht in jedem Fall eine mehrfache Applikation des Antagonisten während der Blütezeit erforderlich (Lindow und Suslow, 2003; Wilson und Lindow, 1993).

P. fluorescens Bk3 wurde ursprünglich aus der Phyllosphere von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox aus einer Obstplantage im Alten Land (Hechthausen) isoliert, in der zu diesem Zeitpunkt sieben Jahre lang keine Biozide mehr eingesetzt worden sind. Erstmals konnte dieses Bakterium als direkter Antagonist von *V. inaequalis*, dem Apfelschorferreger, herausgestellt werden. Weitere Arbeiten zeigten, dass *P. fluorescens* Bk3 zum einen *V. inaequalis* auch unter Freilandbedingungen kontrollieren, zum anderen aber auch bei der Wirtspflanze *M. domestica* cv. Holsteiner Cox die Pflanzen-eigene Abwehr von Pathogenen und damit die Produktion von PRs auslösen kann. Die PRs konnten bei *M. domestica* cv. Holsteiner Cox sowohl auf Transkriptom- und Proteomebene nachgewiesen werden (Fiss, 2001; Kürkcüoglu et al., 2004; Kürkcüoglu, 2006).

Die inhibitorische Wirksamkeit von *P. fluorescens* Bk3 auf *E. amylovora* sowohl unter co-Kultur als auch auf *in vitro* Pflanzen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox ist erstmalig von Schmooch (2006) gezeigt worden.

Eine nähere Charakterisierung der extrazellulären Proteinfraction von *P. fluorescens* Bk3 konnte mehrere Proteine identifizieren, die einen inhibitorischen Effekt auf die Konidienkeimung von *V. inaequalis* zeigten. Der stärkste Effekt konnte hierbei für eine extrazelluläre Protease und ein Peptidoglycan-assoziiertes Lipoprotein nachgewiesen werden (Hossain et al., 2009). Ob diese Proteine auch bei der Inhibierung von *E. amylovora* 222 durch *P. fluorescens* Bk3 eine Rolle spielen, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

1.6.3 *A. pullulans*-Stämme als Antagonisten und Beschreibung von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40

A. pullulans-Stämme kommen weltweit vor und sind auch als „schwarze Hefe“ bekannt, da sie in der Lage sind, Melanin zu produzieren. Sie können in drei Formen vorliegen: lang-filamentös und verzweigt, als Chlamydosporen oder kleinere elliptische Hefe-ähnlichere Zellen.

A. pullulans weist drei verschiedene Unterarten auf: *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum*, und *A. pullulans* var. *aubasidani*. Man findet diese Stämme unter anderem in Erde, Holz, Wasser, Steinen und der Phyllosphäre.

A. pullulans-Stämme produzieren verschiedene Komponenten, dazu gehören Pullulan, ein extrazelluläres Polysaccharid, Siderophore (häufig Ornithin- oder Hydroxamsäure-Derivate) sowie verschiedene hydrolytische Enzyme wie Proteinasen, Lipasen, Zellulasen, Xylanasen, Mannanasen und Transferasen. Gleichzeitig haben diese Stämme eine hohe Toleranz gegenüber Austrocknung und Strahlung, womit sie generell gute Voraussetzungen für den Einsatz als Antagonisten im Freiland haben (Chi et al., 2009).

Verschiedene *A. pullulans*-Stämme konnten bereits eine antagonistische Wirkung oder die Freisetzung inhibitorisch wirksamer Komponenten zeigen.

Die *A. pullulans*-Stämme CF10 und C40 zeigten auf Früchten von *M. domestica* cv. Golden Delicious eine Kontrolle der Phytopathogene *Mucor piriformis*, *Penicillium expansum* und *Botrytis cinerea* durch eine ausgedehnte Besiedlung der Fruchtoberfläche (Leibinger et al., 1997). Der Stamm Y129 produziert beispielsweise eine Komponente unbekannter Natur, die sich inhibitorisch auf *Staphylococcus aureus* auswirkt (McCormack et al., 1994).

A. pullulans CF10 und CF40 werden als Formulierung von der Firma Bio-Protect als BlossomProtect fb angeboten; der Einsatz dieser Formulierung als Pflanzenstärkungsmittel ist in Deutschland gestattet (Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008).

Blüten- und Feldversuche sowie eine Co-Kultur in Flüssigmedium zeigten vielversprechende Ergebnisse; unter Einsatz der Hefen konnten Feuerbrand-Befallsreduktionen bis zu 78% beobachtet werden, sowie eine vollständige Inhibierung von *E. amylovora* in Flüssigkultur.

Neben beiden Hefestämmen enthält die Formulierung einen starken Puffer, der den pH auf 4,0 hält. Zusätzlich sind die Hefen in der Lage, Kulturmedien anzusäuern. *E. amylovora* kann bei einem derart sauren pH nicht wachsen. Es wird vermutet, dass der Wirkmechanismus der Hefen demnach auf eine Ansäuerung der Umgebung zurückzuführen ist (Kunz, 2004; Kunz, 2005; Kunz und Haug, 2006; Seibold et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit soll näher untersucht werden, ob *A. pullulans* CF10 und CF40 tatsächlich nur durch Ansäuerungsprozesse den Feuerbranderreger hemmen, oder noch andere Wirkmechanismen eine Rolle spielen.

1.7 Visualisierung von *E. amylovora* durch Markierung der Bakterien mit Luziferase-Reportergenen

Die Visualisierung und Bewertung inhibitorischer bzw. antagonistischer Effekte auf *E. amylovora* kann auf verschiedenen Wegen stattfinden, beispielsweise durch die Durchführung von Freiland- oder Blütenversuchen, Dual Culture Tests oder Hemmhoftests. Häufig wird hierbei auf die Ausbildung lytischer Zonen hin untersucht, teilungsfähige Zellen erfasst oder die Symptomentwicklung auf Blüten, Blättern oder Zweigen beobachtet (z. B. Cabrefiga et al., 2007; Johnson und Stockwell, 1998; Kunz, 2004; Kunz und Haug, 2006; Temple et al., 2004).

Eine Alternative und zugleich hoch-sensitive Methode ist die Markierung von *E. amylovora* mit Luziferasereportergenen und eine Beurteilung inhibitorischer Effekte auf das Pathogen über Messung von Biolumineszenz.

Biolumineszente Organismen sind in der Natur unter vielen Spezies von Bakterien, Dinoflagellaten, Pilzen, Fischen, Insekten oder Tintenfischen weit verbreitet. Biolumineszente Bakterien sind dabei häufig Parasiten anderer Arten; Fische können bspw. mit ihnen Leuchtorgane ausbilden.

Die Biolumineszenz ist Enzym-katalysiert durch sogenannte Luziferasen; Struktur und Substrat dieser Enzyme ist Spezies-abhängig unterschiedlich (Meighen, 1991).

Die Klassifikation biolumineszenter Bakterien umfasst die Gattungen *Photobacterium*, *Xenorhabdus* und *Vibrio*, wobei nur *Xenorhabdus*-Arten andere Spezies parasitieren.

Ihre Luziferasen katalysieren dabei folgende Reaktion:



RCHO ist ein langkettiger Aldehyd, der im Zuge der Reaktion in Gegenwart von FMNH₂ zu einer Fettsäure (RCOOH) oxidiert wird. FMNH₂ selber wird ebenfalls oxidiert; die Reaktion erfordert die Gegenwart von Sauerstoff, der zu Wasser reduziert wird. Bei der Reaktion wird Energie in Form von Licht – spezifisch für bakterielle Luziferasen – bei einer Wellenlänge von 490 nm freigesetzt. Die Reaktion ist hochspezifisch für FMNH₂; dieses wird nur in stoffwechselaktiven Zellen gebildet. Inhibitorische Effekte auf biolumineszente Bakterien resultieren daher in einer Abschwächung oder einem Ausbleiben der Biolumineszenz (Meighen, 1991).

Wichtigste Gene des Luziferaseoperons sind die Gene *luxABCDE*, die bei den meisten Spezies in der Anordnung *luxCDABE* liegen. *luxAB* kodieren für die Untereinheit der Luziferase, wobei die A-Untereinheit das katalytische Zentrum beinhaltet. *luxC*, *luxD* und *luxE* kodieren für eine Reduktase, Transferase und Synthetase, die das Substrat für die Luziferase, also das langkettige Aldehyd, synthetisieren. Die Substratspezifität kann hierbei variabel ausfallen; Luziferasen von *Vibrio* können beispielsweise besonders effektiv Nonanal und Decanal umsetzen (Greer und Szalay, 2001; Meighen, 1991).

Bakterielles *luxAB* oder auch das gesamte *lux*-Operon können auf andere Organismen übertragen und mit verschiedenen bakteriellen, pflanzlichen oder viralen Promotoren exprimiert werden. Bei ausschließlicher Übertragung von *luxAB* ist die Zugabe eines Substrates zur Erfassung von Biolumineszenz erforderlich, während die Übertragung von *luxABCDE* in autbiolumineszenten Zellen resultiert (Greer und Szalay, 2001).

Biolumineszente *E. amylovora*-Stämme wurden bereits im Vorfeld für verschiedene Versuche eingesetzt. Falkenstein et al. (1989) charakterisierten z.B. mit ihnen Wildtypen von *E. amylovora* sowie Mutanten, die das 29 kDa Plasmid des Feuerbranderreger, das für die Produktion extrazellulärer Polysaccharide benötigt wird, nicht mehr trugen. Über Biolumineszenzmessung mittels eines Röntgenfilms konnte gezeigt werden, dass die

Mutanten sowohl auf Kulturmedium als auch in Gewebe von *P. communis* cv. Bartlett eine geringere Stoffwechselaktivität im Vergleich zum Wildtyp hatten.

Über Biolumineszenzmessung mit Röntgenfilmen konnte auch bereits die Ausbreitung biolumineszenter *E. amylovora* in Blättern, Wurzeln und Stämmen von Apfel-Sämlingen gezeigt werden (Bogs et al., 1998). Azegami et al. (2006) zeigten, dass biolumineszente *E. amylovora* L-1 in der Lage sind, nach Infektion von *M. domestica* cv. Jonagold das Trenngewebe zwischen Zweigen und jungen Früchten zu durchdringen und die Früchte zu infizieren. Die Messung der Biolumineszenz erfolgte hier mit einem 2D-Bioluminometer.

Um die Stoffwechselaktivität von biolumineszenten *E. amylovora* auch über einen Zeitraum von mehreren Tagen beobachten zu können, sind nicht-invasive Methoden zur Biolumineszenzmessung am geeignetsten.

Gau et al. (2002) zeigten die Migration biolumineszenter *P. fluorescens* Bk3 auf *M. domestica* cv. Holsteiner Cox durch Messung der Biolumineszenz mit ultra-sensitiven CCD-Kameras. Diese Methode wurde von Schmooch (2006) ebenfalls angewendet, um die Infektion und Ausbreitung des autobolumineszenten Stammes *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf verschiedenen suszeptiblen und resistenten Kultivaren von *M. domestica* über einen Zeitraum von bis zu 21 Tagen untersuchen zu können. Zudem wurden hier autobolumineszente *E. amylovora* 222::TnluxCDABE genutzt, um die inhibitorische Wirksamkeit von Antagonisten auf dieses Pathogen im Dual Culture Test visualisieren zu können.

Flachkowsky et al. (2010) nutzten ebenfalls einen autobolumineszenten *E. amylovora*-Stamm, um die Suszeptibilität transgener *M. domestica* cv. Holsteiner Cox, die das *Lc* (leaf colour)-Gen von Mais überexprimieren, gegenüber dem Feuerbranderreger zu überprüfen.

1.8 Ziele dieser Promotionsarbeit

Ziel dieser Arbeit ist eine nähere Charakterisierung und Identifizierung der Wirkmechanismen der ausgewählten Feuerbrand-Antagonisten *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie *A. pullulans* CF10 bzw. CF40.

Um inhibitorische Effekte auf den Feuerbranderreger nachweisen zu können, wird ein autbiolumineszenter Stamm (*E. amylovora* 222::TnluxCDABE) verwendet und die Biolumineszenz mittels einer hochsensitiven CCD-Kamera gemessen.

Auf diesem Weg kann untersucht werden, ob die antagonistische Wirksamkeit von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 einen direkten Zellkontakt mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Form von Dual Culture Tests erfordert, oder aber die Antagonisten zusätzlich extrazelluläre Komponenten sekretieren, die den autbiolumineszenten Feuerbranderreger hemmen können.

Extrazelluläre inhibitorisch wirksame Fraktionen werden daraufhin genauer untersucht.

Um Gene zu identifizieren, deren Produkte in die Inhibierung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE involviert sind, soll eine Transposon-Mutagenese mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit anschließendem Screenen der Mutanten auf eine reduzierte antagonistische Wirkung hin durchgeführt werden.

Vergleichende Wachstumsanalysen sollen zusätzlich zeigen, inwieweit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 Wachstumsvorteile unter optimalen und minimalen Bedingungen gegenüber *E. amylovora* 222 haben und ab welchem Zeitpunkt der Co-Kultivierung von Pathogen und Antagonisten eine Inhibierung zu beobachten ist.

Als übergeordnetes Ziel sollen mit diesen Versuchsansätzen Komponenten identifiziert werden, die ein mögliches Potential zur Bekämpfung des Feuerbranderregers im Freiland haben und somit die Anwendung von Antibiotika-haltigen Pflanzenschutzmitteln substituieren.

2. Material und Methoden

2.1 Kulturmedien

LB-Medium:

20 g LB (Luria Broth) von Duchefa werden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst, auf pH 7,2 eingestellt und autoklaviert.

Zusammensetzung von LB:

10 g/L Trypton

5 g/L Hefeextrakt

86 mM NaCl

10 x Minimalmedium 9 (M9)

340 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

220 mM KH₂PO₄

86 mM NaCl

187 mM NH₄Cl

in 1 L destilliertem Wasser lösen, autoklavieren

Zusätzlich:

- 200 mM Hepes pH 7,0
- 20 % Glukose
- 1 M MgCl₃
- 100 mM Asparagin, Methionin, Glycin, Prolin, Arginin oder Asparaginsäure
- 50 mM NaNO₃
- 50 mM CaCl₂

Als Lösungsmittel wird jeweils destilliertes Wasser verwendet, Hepes, MgCl₃, NaNO₃ und CaCl₂ werden autoklaviert, die übrigen Komponenten sterilfiltriert .

Für 1 x M9-Medium (komplettiert) werden 5 ml 10 x Minimalmedium 9, 5 ml 200 mM Hepes pH 7,0, 1,25 ml 20% Glukose, 5 ml der gewünschten Aminosäure (100 mM) und 50 µl 1 M MgCl₃ auf 50 ml mit sterilem destilliertem Wasser aufgefüllt. Bei Bedarf wird die jeweilige Aminosäure durch 5 ml 50 mM NaNO₃ ersetzt, bzw. 25 µl 50 mM CaCl₂ zugegeben.

Difco™ Potato-Dextrose-Broth (PDB)

24 g PDB von Becton, Dickinson and Company werden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst, auf pH 5,6 eingestellt und autoklaviert.

Zusammensetzung von PDB:

4 g/L Kartoffelstärke

111 mM D-Glukose

2.2 Kulturagar

LB-Agarplatten:

30 g LB-Agar von Duchefa werden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst, auf pH 7,2 eingestellt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60°C werden bei Bedarf 500 µl Ampicillin (100 mg/ml in destilliertem Wasser, sterilfiltriert) oder Kanamycin (50 mg/ml in destilliertem Wasser, sterilfiltriert) zugegeben und die Lösung in Kulturschalen (94/16 mm) gegossen. Lagerung bei 4°C. Die Ampicillin-Endkonzentration beträgt 100 µg/ml Kulturmedium (Amp¹⁰⁰ Platten), die Kanamycin-Endkonzentration 50 µg/ml (Kan⁵⁰ Platten).

Zusammensetzung von LB-Agar:

10 g/L Trypton

5 g/L Hefeextrakt

86 mM NaCl

15 g/L Agar

Potato-Dextrose-Agarplatten

39 g PDB von Becton, Dickinson and Company werden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst, auf pH 5,6 eingestellt und autoklaviert.

Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird die Lösung in Kulturschalen (94/16 mm) gegossen. Lagerung bei 4°C.

Zusammensetzung von PDB:

4 g/L Kartoffelstärke

111 mM D-Glukose

15 g/L Agar

Kings B Agarplatten (King et al., 1954):

20 g/L Pepton

9 mM K₂HPO₄

6 mM MgSO₄ x 7 H₂O

15 g/L Agar

Alle Komponenten werden in destilliertem Wasser gelöst, auf pH 7,2 eingestellt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird die Lösung in Kulturschalen (94/16 mm) gegossen. Lagerung bei 4°C.

NBS-Agarplatten (Kunz, 2005)

5 g/L Pepton

3 g/L Fleisch Extrakt

146 mM Saccharose

20 g/L Agar

Alle Komponenten werden in destilliertem Wasser gelöst, auf pH 5,8 eingestellt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird die Lösung in Kulturschalen (94/16 mm) gegossen. Lagerung bei 4°C.

NBSP-Agarplatten, gepufferter NBS-Agar (Kunz, 2005)

5 g/L Pepton

3 g/L Fleisch Extrakt

146 mM Saccharose

40 mM KH_2PO_4

61 mM K_2HPO_4

20 g/L Agar

Alle Komponenten werden in destilliertem Wasser gelöst, auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird die Lösung in Kulturschalen (94/16 mm) gegossen. Lagerung bei 4°C.

Minimalagarplatten für E. amylovora (Modifiziert nach Vanneste et al., 1992)

1,5 g/L L-Asparagin

26 mM KH_2PO_4

9 mM K_2HPO_4

0,2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

8 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

1 mM Natriumcitrat

10 g/L Agar

Alle Komponenten werden in ca. 950 ml destilliertem Wasser gelöst, auf pH 7,2 eingestellt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50°C werden 111 mM Glukose, 2 mM Nicotinsäure und 0,6 mM Thiamin-Hydrochlorid (gelöst in ca. 50 ml destilliertem Wasser, sterilfiltriert) zugegeben. Die Lösung wird in Kulturschalen (94/16 mm) gegossen. Lagerung bei 4°C.

MG-Agar (Mannitol Glutamat Minimal Medium, Keane et. al, 1970):

55 mM Mannitol

4 mM KH_2PO_4

3 mM NaCl

0,8 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

15 g/L Agar

Alle Komponenten werden in destilliertem Wasser gelöst, auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird 12 mM l-Glutaminsäure (mono-Natriumsalz) zugegeben und die Lösung in Kulturschalen (94/16 mm) gegossen. Lagerung bei 4°C.

2.3 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Die Glycerin-Dauerkulturen folgender Bakterienstämme wurden verwendet:

***E. coli* S17-1 $\alpha\lambda$ -pir**

***E. amylovora* 222**, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. A. Peil, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Dresden-Pillnitz.

***E. amylovora* 222::TnluxCDABE**, erstellt am Institut für Botanik, Leibniz Universität Hannover, durch Transformation mit dem Transposon-Plasmid pRL1406.

***P. fluorescens* A506 bzw. Bk3**, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Auling, Institut für Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover.

***P. fluorescens* A506::TngfpluxAB und Bk3::TngfpluxAB**, erstellt am Institut für Botanik, Leibniz Universität Hannover, durch Transformation mit dem Transposon-Plasmid pUTgfpluxAB.

***P. fluorescens* 2-79 bzw. Pf-5**, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. L. Thomashow, Department of Plant Pathology, Washington State University, Pullman, USA und Dr. A. Rooney, ARS Culture Collection, Peoria IL, USA.

***A. pullulans* CF10 und CF40**, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Kunz, Bio-Protect Gesellschaft für biologischen Pflanzenschutz mbH, Konstanz.

***E. coli* DH5 α λ mcr**, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. W. W. Metcalf, Department of Microbiology, University of Illinois at Urbana-Champaign.

***E. coli* DH5 α λ -pir pRL27**, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. W. W. Metcalf, Department of Microbiology, University of Illinois at Urbana-Champaign.

***E. coli* DH5 α pRL1406**, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. C. P. Wolk, MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University.

Folgende Plasmide wurden verwendet:

pUTgfpluxAB, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Unge, Department of Biochemistry, Stockholm University, S-10691 Stockholm, Schweden.

Das Plasmid hat eine Größe von ca. 12 kb und vermittelt eine Ampicillin (*bla*)- und Kanamycin (*nptII*)-Resistenz; *gfpluxAB* steht unter der Kontrolle eines *PpsbA*-Promotors und kann durch ein Tn5-Minitransposon zusammen mit *nptII* ins Genom seiner Wirtszelle integriert werden.

Mit *luxAB* werden die Gene für die bakterielle Luciferase übermittelt; mit *gfp* das Gen für das Green Fluorescence Protein aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria*.

Positive pUTgfpluxAB-Transformanten sind lumineszent bei Zugabe eines geeigneten Substrates (Decanal); gleichzeitig zeigen sie durch GFP eine grüne Fluoreszenz bei Anstrahlen mit UV-Licht und sind Kanamycin-resistent.

Der Replikationsursprung dieses Plasmids ist RK6. RK6 benötigt das π Protein (kodiert durch *pir*), damit eine Replikation des Plasmids ermöglicht wird. Entweder muss der Empfängerstamm das Transposon dieses Plasmids ins Genom integriert haben, um eine Kanamycin-Resistenz, Biolumineszenz und Fluoreszenz zu zeigen, oder aber das *pir*-Gen im

Genom haben. Aus diesem Grund wird das Plasmid für π^- -Stämme als Selbstmordplasmid bezeichnet.

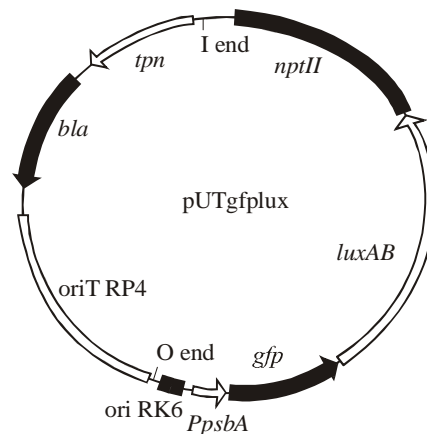


Abb. 2.3.1 pUTgfpluxAB. Abbildung von Dr. A. E. Gau.

pUT, Derivat von pUTgfpluxAB, wobei die gfpluxAB-Kassette über eine *NotI*-Spaltung herausgespalten und das Plasmid religiert wurde. Über das Transposon kann nach Transformation nur noch das *nptII*-Gen in das Genom der Wirtszelle integriert werden.

pRL1406, als Dauerkultur in *E. coli* DH5 α , freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. C. P. Wolk, MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University. Das Plasmid hat eine Größe von ca. 15 kb und trägt eine Kanamycin- und Spectinomycin-Resistenz. Es trägt das gesamte promotorlose *lux*-Operon mit den Genen *luxCDABE*. Das Operon kann durch ein Tn5-Minitransposon zusammen mit dem Gen für die Kanamycin-Resistenz ins Genom seiner Wirtszelle integriert werden. Nach Integration sind die Wirtszellen autolumineszent und Kanamycin-resistent, sofern das Operon hinter einem konstitutiv exprimierten Promotor in das Genom integriert wurde.

pRL27, als Dauerkultur in *E. coli* DH5 α λ -pir, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. W. W. Metcalf, Department of Microbiology, University of Illinois at Urbana-Champaign. Das Plasmid hat eine Größe von ca. 4 kb. Es besitzt einen RP4 origin of transfer (*oriT*), der eine Übertragung des Plasmids via Konjugation mit den *E. coli* Donorzellen erlaubt. Zusätzlich hat es eine mutierte Version des Tn5 *tnp*-Gens, das für eine hyperaktive Transposase (Goryshin und Reznikoff, 1998) unter Kontrolle des *tetAp* Promotors kodiert. *tetAp* und *tnp* liegen außerhalb des Transposons und werden bei der Transposition nicht übertragen. Das Transposon selbst besteht aus dem *nptII*-Gen (Kanamycin-Resistenz) und dem R6K DNA Replikationsursprung. Dieser ermöglicht eine spätere Klonierung der Insertionsmutanten. R6K benötigt das π Protein (kodiert durch *pir*), damit eine Replikation des Plasmids ermöglicht wird. Entweder muss der Rezipientenstamm dieses Plasmids also das Transposon ins Genom integriert haben, um eine Kanamycin-Resistenz zu zeigen, oder aber das *pir*-Gen im Genom haben.

pBluescript SK der Firma Stratagene

f1 (-) origin 24–330
β-galactosidase α-fragment 463–816
multiple cloning site 653–760
lac promoter 817–938
pUC origin 1158–1825
ampicillin resistance (bla) ORF 1976–2833

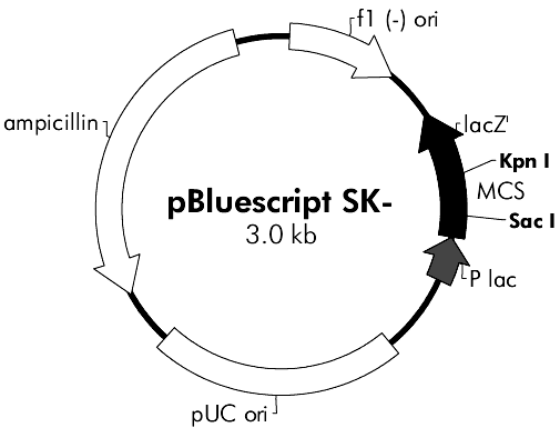
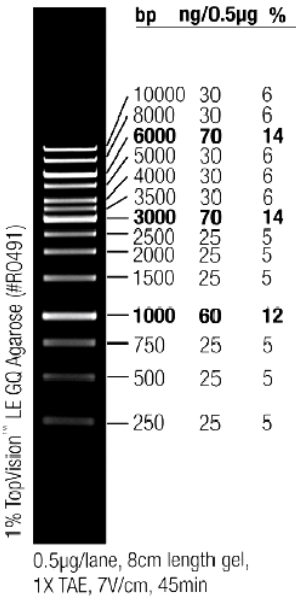


Abb. 2.3.2 pBluescript SK Vektorkarte, abgeändert nach einer Abbildung von Stratagene

2.4 Verwendete DNA-Marker

Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder



λ-DNA HindIII Marker

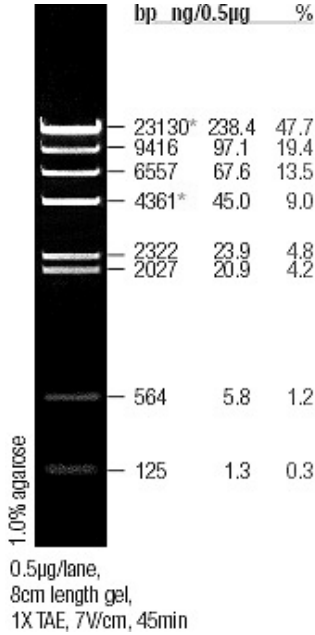


Abb. 2.4.1 Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder und λ-DNA HindIII Marker, abgeändert nach einer Abbildung von Fermentas.

2.5 Verwendete Proteinmarker

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard von Invitrogen

| Protein | apparente molare Massen (kDa) | | | | |
|------------------------|-------------------------------|---------|-------------|--------------|----------------------|
| | Tris-Glycine | Tricine | NuPAGE® MES | NuPAGE® MOPS | NuPAGE® Tris-Acetate |
| Myosin | 250 | 210 | 188 | 191 | 210 |
| Phosphorylase | 148 | 105 | 98 | 97 | 111 |
| BSA | 98 | 78 | 62 | 64 | 71 |
| Glutamic Dehydrogenase | 64 | 55 | 49 | 51 | 55 |
| Alcohol Dehydrogenase | 50 | 45 | 38 | 39 | 41 |
| Carbonic Anhydrase | 36 | 34 | 28 | 28 | n/a |
| Myoglobin Red | 22 | 17 | 17 | 19 | n/a |
| Lysozyme | 16 | 16 | 14 | 14 | n/a |
| Aprotinin | 6 | 7 | 6 | n/a | n/a |
| Insulin, B Chain | 4 | 4 | 3 | n/a | n/a |

NuPAGE® Novex Bis-Tris 4-12% Gel

Abb. 2.5.1 SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard von Invitrogen, ungefähre Molekulargewichte der Standards unter verschiedenen Laufbedingungen. Abbildung abgeändert nach einer Abbildung von Invitrogen.

2.6 Transformation von *E. coli*, *P. fluorescens* und *E. amylovora*

Die Übertragung von Plasmid-DNA auf elektrokompente Zellen wird per Elektroporation durchgeführt. Zur Herstellung lässt man die gewünschten Zellen bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,6 bei 600 nm (OD₆₀₀) wachsen und entsalzt sie anschließend. Damit wird gewährleistet, dass beim folgenden Elektroschock kein Kurzschluss entsteht.

Die Elektroporation führt zu einer kurzzeitigen Perforation der Bakterienmembran. Da gleichzeitig die eingesetzte DNA im elektrischen Feld bewegt wird, können die Bakterien auf diesem Weg DNA aufnehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Elektroporation eingesetzt, um *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit pUTgfpluxAB sowie *E. amylovora* 222 mit pRL1406 zu transformieren und dadurch biolumineszente Zellen zu generieren.

Ferner wird die Elektroporation benötigt, um Plasmid pUT herzustellen, um eine Mutagenese mit *P. fluorescens* A506 durchführen zu können und um den Integrationsort der Mutation nach Mutagenese von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bestimmen zu können.

2.6.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Material:

LB-Medium (siehe 2.1)

Glycerin-Dauerkulturen (*E. amylovora* 222, *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, *E. coli* S17-1 α λ -pir)

15% Glycerin, 4°C

Steriles destilliertes Wasser, 4°C

Schüttelinkubator, 37°C bzw. 28°C

Flüssiger Stickstoff, Sarstedt-Röhrchen (50 ml), GSA-Becher

Photometer Beckman Coulter UV-DU 7500 von Beckman Coulter GmbH

Zentrifugen: Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge von Du Pont Instrument und Jouan CR3i von Jouan Industries, S.A.S.

Durchführung:

Ein 5 ml LB-Röhrchen wird mit 10 μ l der Bakterien-Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C (*E. coli*) bzw. 28°C (*P. fluorescens* und *E. amylovora*) auf dem Schüttelinkubator inkubiert.

1 ml der Vorkultur werden auf 125 ml LB-Medium überimpft und bei entsprechender Temperatur im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,6 bei 600 nm angezogen.

Die Zellsuspension wird 15 Minuten auf Eis abgekühlt und 10 Minuten bei 4000 x g und 4°C in GSA-Bechern abzentrifugiert. Alle weiteren Schritte finden bei 4°C statt. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 125 ml Wasser wieder aufgenommen.

Es folgt ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4000 x g in GSA-Bechern. Erneut wird der Überstand verworfen und das Pellet in 125 ml Wasser aufgenommen. Nach Wiederholung der Zentrifugation wird das Pellet in 12,5 ml 15% Glycerin aufgenommen und 30 Minuten bei 4000 x g in Sarstedt-Röhrchen abzentrifugiert.

Das Pellet wird anschließend in dem 1,5-fachen Volumen an 15% Glycerin aufgenommen und Aliquots von 100 μ l erstellt. Diese werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.6.2 Transformation von elektrokompenten *E. coli* S17-1 α λ -pir, *E. coli* DH5 α λ -pir, *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *E. amylovora* 222

Material:

Plasmid-DNA (pUTgfpluxAB, pRL1406; Isolierung siehe 2.12)

pBluescript SK mit Mutagenese-Inserts der *P. fluorescens* A506-Mutanten bzw. religierte genomische DNA der *P. fluorescens* Bk3-Mutanten (siehe 2.11)

LB-Medium (siehe 2.1)

LB-Kanamycin (50 μ g/ml)-Agarplatten, LB-Ampicillin (100 μ g/ml)-Agarplatten (siehe 2.2)

Elektroporationsküvetten

Elektroporationsgerät Electro Cell Manipulator 395 von BTX

Schüttelinkubator (37°C bzw. 28°C), Inkubator (37°C bzw. 28°C), Eis

Elektrokompetente Zellen aus 2.6.1

Zentrifuge Jouan CR3i von Jouan Industries, S.A.S.

Durchführung:

Die Elektroporationsküvetten werden auf Eis vorgekühlt, die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut.

100 µl elektrokompetente Zellen werden mit ca. 500 ng Plasmid-DNA versetzt und bei 1,25 kV elektroporiert.

Nach Zugabe von 1000 µl LB-Medium werden die Zellen für eine Stunde in einem Eppendorfgefäß mit durchlöcherter Deckel bei 37°C (*E. coli*) bzw. für mindestens vier Stunden (bis über Nacht) bei 28°C (*P. fluorescens* und *E. amylovora*) im Schüttelinkubator inkubiert.

Jeweils 50 und 100 µl der Transformation werden auf LB-Ampicillin-Platten (*E. coli*) bzw. auf LB-Kanamycin-Platten (*P. fluorescens* und *E. amylovora*) ausplattiert. Der restliche Transformationsansatz wird für eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100 µl verworfen und das Bakterienpellet darin wieder aufgenommen. Anschließend wird dieser Rest ebenfalls auf den entsprechenden Selektionsnährböden ausplattiert.

Die ausplattierte Transformation wird über Nacht bei 37°C (*E. coli*) bzw. bei 28°C (*P. fluorescens* und *E. amylovora*) inkubiert.

Der Erfolg der Transformationen mit den Plasmiden pUTgf_{lux}AB und pRL1406 wird durch Messung der Biolumineszenz gewachsener Kolonien überprüft.

Positive Transformanten werden wie folgt benannt:

E. amylovora 222::TnluxCDABE

P. fluorescens A506 bzw. Bk3::Tngf_{lux}AB

E. coli S17-1αλ-pir pUTgf_{lux}AB

2.7 Biolumineszenzmessung mit der CCD-Kamera

Im Folgenden wird die Möglichkeit einer nicht-invasiven Methode zur Beobachtung von Bakterien gezeigt. Durch Übertragung der Luziferase-Gene *luxAB* auf *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und des *lux*-Operons auf *E. amylovora* 222 können die Bakterien die Strukturgene der bakteriellen Luciferase *luxA* und *B* oder zusätzlich die Gene *luxC*, *luxD* und *luxE* (eine Reduktase, Transferase und Synthetase) exprimieren, letztere können ein langkettiges Aldehyd als Substrat für die Luciferase bilden.

Die Biolumineszenz der transformierten Bakterien auf einer Kulturplatte wird mittels einer auf -35°C gekühlten hochsensitiven CCD-Kamera in einer Dunkelkammer gemessen.

Bei der hier verwendeten Kamera handelt es sich um eine Quantix (Photometrics) mit einem vorderilluminiertem Kodak KAF 1401E Chip, gekoppelt an ein Schneider/Kreuznach Xenon 0,015/17 mm Objektiv. Die Kamera dient zur Aufnahme von Aufsichtbildern und wird über das Programm Lightview32 (Photometrics) auf einem Windows-NT-Computer kontrolliert. Die aufgenommenen Bilder werden im TIFF-Format gespeichert und mit IP-Lab 3.06 sowie Corel Draw 10.0 und Corel Photo Paint 10.0 bearbeitet.

Material:

Transformanden aus 2.6

Dual Culture Tests und Vorinkubationsversuche aus 2.8 und 2.22

Hemmhoftests aus 2.23

Dunkelkammer mit integrierter Cleanbench

oben beschriebene CCD-Kamera

Durchführung:

Von Platten mit Bakterienkulturen wird zunächst ein Lichtbild aufgenommen (Belichtungszeit: 1 ms, Gain: 3, Binning: 4 x 4). Anschließend wird das Autolumineszenzbild, abhängig von der Stärke der Lumineszenz, mit einer Belichtungszeit zwischen 5 Sekunden und 2 Minuten (Gain: 3, Binning: 4 x 4) gemessen. Die Bilder werden mit IP-Lab 3.06 (Scanalytic), Corel Photo Paint 10.0 und Corel Draw 10.0 bearbeitet.

2.8 Dual Culture Tests

Mittels der hier durchgeführten Dual Culture Tests soll gezeigt werden, inwieweit die für diese Arbeit ausgewählten Antagonisten in der Lage sind, die Stoffwechselaktivität des Feuerbranderregers zu beeinflussen.

Der autolumineszente Stamm *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wird hierfür in gleicher Zellzahl mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 oder *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 versetzt. Nach Aufspotten auf Agarplatten wird die Entwicklung der Biolumineszenz über einen definierten Zeitraum beobachtet.

Inhibitorische Wirkungen der Antagonisten resultieren in einer verminderten oder ausbleibenden Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Für die Dual Culture Tests werden Bakteriensuspensionen mit bestimmten Zellzahlen erstellt; das Auszählen der Bakterien erfolgt mit einer Thoma-Zählkammer.

Eine Thoma-Kammer hat dabei die Abmessungen eines Objekträgers. Durch zwei Ausfräsungen werden drei Stege ausgebildet, wobei der Mittelsteg gegenüber den Seitenstegen definiert um 100 µm abgesenkt ist. In den Mittelsteg sind zwei Gitternetze aus Groß- und Kleinquadraten eingeztzt. Eine Zählkammer hat 16 Großquadrate, die in jeweils 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Wird ein Deckglas auf die Seitenstege aufgelegt, so ergibt sich über den Quadraten ein definiertes Volumen (für ein Kleinquadrat: 0,05 mm x 0,05 mm x 0,1

$\text{mm} = 0,00025 \text{ mm}^3$, siehe Abb. 2.18.1.1). Aus diesem Volumen über einem Kleinquadrat ergibt sich der Kammerfaktor von 4000, mit dem die Zellzahl/ μl Kulturmedium ermittelt werden kann.

2.8.1 Bestimmung der Zellzahl von Bakterien- und Hefekulturen

LB-Medium bzw. PD-Medium (siehe 2.1)

E. amylovora 222::TnluxCDABE

P. fluorescens A506 bzw. Bk3, Wildtyp und im Rahmen dieser Arbeit erzeugte Mutanten

A. pullulans CF10 bzw. CF40

destilliertes Wasser

Thoma-Zählkammer von Zeiss

Lichtmikroskop von Zeiss

Kulturschüttler (28°C)

Durchführung:

Die *P. fluorescens*-, *E. amylovora*- und *A. pullulans* - Stämme werden von einer Agarplatte gepickt, in 5 ml LB- bzw. PD-Röhrchen überführt und über Nacht bei 28°C inkubiert.

Aus der Übernachtskultur wird eine 1:40 (*P. fluorescens*, *E. amylovora*) bzw. eine 1:20 (*A. pullulans*) Verdünnung mit destilliertem Wasser erstellt, die Thomakammer damit beladen und insgesamt 16 Kleinquadrate bei 400-facher Vergrößerung nach folgendem Prinzip ausgezählt:

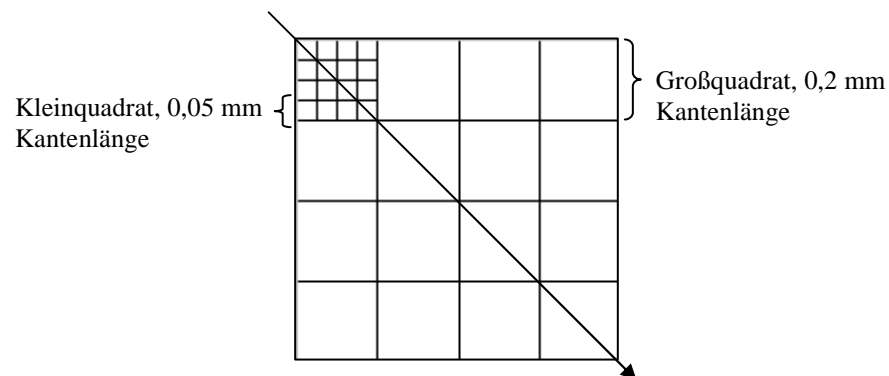


Abb.2.8.1.1 Schema einer Thoma-Zählkammer. Grafik von der Autorin.

Anschließend wird die durchschnittliche Zellzahl pro Kleinquadrat ermittelt und mit diesem Wert und folgender Formel die Zellzahl pro μl Kulturmedium ermittelt:

$$\varnothing \text{Zellzahl/Kleinquadrat} \times 4000 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \underline{\underline{\text{Zellzahl}/\mu\text{l}}}$$

2.8.2 Prinzip von Dual Culture Tests mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und den eingesetzten Antagonisten

Material:

LB- und PD-Medium (siehe 2.1)

LB-, PD-, NBS- und NBSP-Agarplatten (siehe 2.2)

P. fluorescens A506 bzw. Bk3

A. pullulans CF10 und CF40

E. amylovora 222::TnluxCDABE

Kulturschüttler, 28°C

Durchführung:

Die *P. fluorescens*-, *E. amylovora*- und *A. pullulans* - Stämme werden von einer Agarplatte gepickt, in 5 ml LB- bzw. PD-Röhrchen überführt und über Nacht bei 28°C inkubiert.

Je 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE werden mit jeweils 1×10^7 Zellen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 vermischt und in einem Endvolumen von 10 µl auf LB-Agarplatten punktförmig aufgetragen.

Genauso werden 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit jeweils 1×10^7 Zellen von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 vermischt und in einem Endvolumen von 10 µl auf PD-, NBS- oder NBSP-Agarplatten punktförmig aufgetragen.

Als Kontrolle werden die einzelnen Bakterienstämme in entsprechender Zellzahl ohne Antagonisten auf die genannten Agarplatten in einem Endvolumen von 10 µl punktförmig aufgetragen. Die Platten werden bei 28°C inkubiert und die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE über einen Zeitraum von drei Tagen beobachtet (siehe 2.7).

2.9 Erstellung des Vektors pUT

Zur Mutagenese von *P. fluorescens* A506 wird aus dem Vektor pUTgfpluxAB der Vektor pUT hergestellt, indem über eine *NotI*-Spaltung die gfpluxAB-Kassette herausgespalten und der Vektor anschließend religiert wird. Das so generierte Plasmid kann auf einen Wirtsorganismus übertragen werden und ausschließlich das *nptII*-Gen, dass eine Kanamycin-Resistenz vermittelt, durch die Transposase an zufälliger Position in das Genom des Wirtsorganismus‘ integriert werden.

2.9.1 *NotI*-Spaltung von pUTgfpluxAB

Material:

Plasmidpräparation von pUTgfpluxAB (Durchführung Präparation siehe 2.12)

NotI von Fermentas (10 Unit/µl)

10 x Puffer Orange+ von Fermentas (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,5)
steriles destilliertes Wasser
Inkubator, 37°C, Heizblock, 80°C

Durchführung:

Ca. 30 µg Plasmid aus der Präparation werden mit 10 µl 10 x Puffer Orange+ und 10 Units *NotI* versetzt und der Ansatz mit sterilem destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Die Spaltung findet über Nacht bei 37°C statt und das Enzym wird anschließend durch eine 10-minütige Inkubation bei 80°C inaktiviert.

Der Ansatz wird auf ein 1%iges Agarosegel (siehe 2.16) aufgetragen, um die pUT-Bande ausschneiden und so von der gfpluxAB-Bande abtrennen zu können.

2.9.2 Aufreinigung von pUT aus einem Agarosegel

Material:

Restriktionsenzymspaltung aus 2.9.1

QIAEXII Gel Extraction Kit von Qiagen (enthält QIAEX II Lösung, Puffer QX1 (mit pH Indikator), Puffer PE)

steriles destilliertes Wasser

Skalpell, Heizblock (50°C)

Jouan CR3i von Jouan Industries, S.A.S

Durchführung:

Der Vektor pUTgfpluxAB hat eine Größe von etwa 12 kb, wobei die gfpluxAB-Kassette eine Größe von etwa 4 kb hat. Nach Auftrag der Spaltung aus 2.6.1 sollte auf dem Gel also eine etwa 4 kb große Bande zu sehen sein, sowie zusätzlich eine etwa 8 kb große Bande, die das Rückrad pUT zusammen mit dem *nptII*-Gen für die Kanamycinresistenz darstellt.

Die etwa 8 kb große Bande wird unter UV-Licht-Kontrolle mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt.

Das ausgeschnittene Gelstück wird gewogen und anschließend die Extraktion der DNA aus dem Gel nach dem Protokoll des Herstellers des Kits durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wird in 50 µl sterilem destilliertem Wasser aufgenommen.

Es wird ein 1%iges Agarose-Kontrollgel von der Aufreinigung angefertigt (siehe 2.16), die aufgereinigte DNA wird bei -20°C gelagert.

2.9.3 Religation von pUT

Material:

Aufreinigung aus 2.9.2

T4 DNA Ligase (1 Unit/µl) von Fermentas

10 x Ligationspuffer von Fermentas (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8)
steriles destilliertes Wasser

Durchführung:

20 µl der Aufreinigung aus 2.9.2 werden mit einem Unit Ligase und 3 µl Ligationspuffer versetzt.

Der Ansatz wird auf 30 µl mit sterilem destilliertem Wasser aufgefüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Das Enzym wird durch eine Erhitzung auf 80°C für 10 Minuten inaktiviert.

5 µl des Ligationsansatzes werden per Elektroporation in elektrokompente *E. coli* S17-1 α λ -pir übertragen (siehe 2.6) und aus erfolgreichen Transformationen das neu generierte Plasmid pUT isoliert (Isolierung von Plasmiden siehe 2.12).

2.10 Mutagenese von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Sowohl *P. fluorescens* A506 als auch Bk3 sollen über eine Insertionsmutagenese mutagenisiert werden. Bei der hier durchgeführten Mutagenese wird das *nptII*-Gen (Kanamycin-Resistenz) über ein Tn5-Transposon per Zufall ins Genom des Wirtsorganismus integriert. Hierbei können Gene unterbrochen werden, die in direktem Zusammenhang mit der inhibitorischen Wirkung der gewählten Antagonisten gegenüber *E. amylovora* stehen.

Einzelne Mutanten werden im Anschluss an die Mutagenese auf eine reduzierte inhibitorische Wirkung gegenüber dem Feuerbranderreger hin gescreent.

Die Mutagenese von *P. fluorescens* A506 erfolgt über eine Elektroporation elektrokompenter Zellen mit dem Plasmid pUT, die Mutagenese von *P. fluorescens* Bk3 via Konjugation mit *E. coli* DH5 α pir pRL27.

Als Donorstamm von pRL27 dient *E. coli* DH5 α pir pRL27 (Larsen et al., 2002). Dieser Stamm weist zum einen die *mob*-Region auf, die für ein Mobilisierungsprotein kodiert, was Einzelstrangbrüche im Plasmid verursacht und eine Übertragung via Konjugation überhaupt erst ermöglicht. Zusätzlich sind die *tra*-Gene kodiert, deren Produkte den F-Pilus aufbauen und damit den Kontakt zwischen Donor- und Rezipientenzelle herstellen.

2.10.1 Mutagenese von *P. fluorescens* A506 via Transformation mit pUT

Material:

Plasmid-DNA von pUT (Erstellung von pUT siehe 2.9)

LB-Medium (siehe 2.1)

LB-Kanamycin (50 µg/ml)-Agarplatten (siehe 2.2)

Elektroporationsküvetten, Elektroporationsgerät (Electro Cell Manipulator 395 von BTX), Schüttelinkubator (28°C), Inkubator (28°C), Eis

Elektrokompetente Zellen von *P. fluorescens* A506

Durchführung:

Die Elektroporation wird wie unter 2.6 beschrieben durchgeführt.

Nach Zugabe von 1000 µl LB-Medium werden die Zellen in einem Eppendorfgefäß mit durchlöcherter Deckel bei 28°C über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert.

Jeweils 30 µl der Transformationsansätze werden anschließend auf LB-Agarplatten (mit 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Insgesamt werden 30 Platten erstellt.

Die gewachsenen Insertionsmutanten von *P. fluorescens* A506 werden gepickt und auf LB-Agarplatten (mit 50 µg/ml Kanamycin) vereinzelt.

2.10.2 Mutagenese von *P. fluorescens* Bk3 via Konjugation mit *E. coli* DH5αλ-pir pRL27

Material:

P. fluorescens Bk3 (Rezipient)

E. coli DH5αλpir pRL27 (Donor)

MG-Agarplatten (siehe 2.2, Mannitol Glutamat Minimal Medium)

MG-Agarplatten (siehe 2.2, mit Kanamycin, 50 µg/ml und Ampicillin, 100 µg/ml)

LB-Agarplatten (siehe 2.2)

LB-Agarplatten (siehe 2.2, mit Kanamycin, 50 µg/ml)

steriles, destilliertes Wasser

96-well Platten, jedes well befüllt mit 150 µl LB-Agar (mit Kanamycin, 50 µg/ml)

Durchführung:

Drei Tage vor der Konjugation wird *P. fluorescens* Bk3 auf MG-Agar ausgestrichen und bei 28°C inkubiert. Einen Tag vor der Konjugation wird der Donor-Strain *E. coli* DH5αλpir pRL27 auf LB-Agar (mit 50 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Von jeder Platte wird ein Inoculation loop (ca. 1*1 cm) der Kulturen mittels einer Impföse abgetragen und in 1 ml steriles destilliertes Wasser überführt.

Nach Resuspension der Bakterien im Wasser werden jeweils 20 µl von Donor- und Rezipientenstamm vermischt und zweimal jeweils 20 µl auf LB-Agar gespottet. Die Platten werden über Nacht bei 28°C inkubiert.

Am nächsten Morgen werden die Spots von der Platte abgetragen, in 1 ml steriles destilliertes Wasser überführt und 1:10 mit sterilem destillierten Wasser verdünnt.

Jeweils 200 µl werden auf MG-Agar (mit Kanamycin, 50 µg/ml und Ampicillin, 100 µg/ml) ausplattiert und 3 Tage bei 28°C inkubiert. Gewachsene Kolonien werden auf 96-well Platten vereinzelt.

2.10.3 Screening der Mutanten auf eine reduzierte inhibitorische Wirkung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE

Material:

P. fluorescens A506 bzw. Bk3-Mutanten aus 2.10.1 und 2.10.2

Wildtyp von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

E. amylovora 222::TnluxCDABE

LB-Agarplatten (siehe 2.2, mit und ohne 50 µg/ml Kanamycin)

Kulturschüttler, 28°C

Durchführung:

Das Screening der Mutanten erfolgt in drei Etappen:

Etappe eins:

Die vereinzelt *P. fluorescens* A506- bzw. Bk3-Mutanten werden gepickt, auf LB-Agarplatten (mit 50 µg/ml Kanamycin) überführt und mit 5 µl einer Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bedeckt. Mutanten, die nicht in der Lage sind, die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE innerhalb von zwei Tagen komplett zu unterdrücken (Biolumineszenzmessung siehe 2.7), werden in Etappe zwei nachgescreent.

Etappe zwei:

Jeweils 5 µl von Übernachtskulturen vorselektierter Mutanten aus Runde eins werden mit 5 µl einer Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE vermischt und punktförmig auf LB-Agarplatten (mit 50 µg/ml Kanamycin) aufgetragen. Mutanten, die nicht in der Lage sind, die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE innerhalb von zwei Tagen vollständig zu unterdrücken (Biolumineszenzmessung siehe 2.7), werden in Etappe drei unter Einsatz gleicher Zellzahlen nachgescreent.

Etappe drei:

Runde drei entspricht in der Durchführung der in 2.8.2 aufgeführten Methodik unter Einsatz gleicher Zellzahlen von Pathogen und Antagonist.

Mit den auf diesem Wege selektierten Mutanten, die nur noch eine eingeschränkte Hemmung gegenüber dem Feuerbranderreger aufweisen, werden weitergehende Untersuchungen durchgeführt (siehe 2.11, 2.17, 2.21, 2.23).

2.11 Detektion des Integrationsortes des Tn5-Transposons bei den *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3- Mutanten

Aus Mutanten von *P. fluorescens* A506, die nur noch eine eingeschränkte Hemmung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zeigen, wird zunächst die genomische DNA isoliert und mit *EcoRV* gespalten.

Anschließend werden diese Fragmente in pBluescript SK ligiert, in *E. coli* DH5 α transformiert und auf Kanamycin-resistente Transformanten gescreent, da im Zuge der Mutagenese das Kanamycin-Resistenzgen *nptII* übertragen worden ist.

Aus Kanamycin-resistenten Transformanten wird dann Plasmid-DNA isoliert, die Größe des Inserts überprüft und Plasmide mit Insert zum Sequenzieren geschickt.

Anders verhält es sich bei *P. fluorescens* Bk3 Mutanten. Auch hier wird genomische DNA isoliert und anschließend eine Restriktionsenzymspaltung mit *Bgl*III durchgeführt; die Fragmente aber direkt religiert und auf *E. coli* DH5 α pir übertragen. Auch hier wird auf Kanamycin-resistente Transformanten hin gescreent, die Plasmid-DNA isoliert und anschließend zum Sequenzieren geschickt.

2.11.1 Detektion des Integrationsortes des Transposons bei *P. fluorescens* A506-Mutanten

Isolierung genomischer DNA aus *P. fluorescens* A506 siehe 2.13.1

Restriktionsenzymspaltung der genomischen DNA und von pBluescript SK

Material:

genomische DNA der *P. fluorescens* A506 Mutanten

Plasmidpräparation von pBluescript SK

*Eco*RV (10 U/ μ l) von Fermentas

1-4 inoculation buffer, Hybaid

Calf intestine alkalische Phosphatase (CIAP, 1 U/ μ l) von Fermentas

steriles destilliertes Wasser

Heizblock (37°C)

Durchführung:

Je ca. 4 μ g genomische DNA werden mit 1 μ l 1-4 inoculation buffer und 10 U *Eco*RV versetzt und mit destilliertem Wasser auf 10 μ l aufgefüllt. Um ausreichend gespaltenes Plasmid zur Verfügung zu haben, werden ca. 30 μ g Plasmidpräparation von pBluescript SK mit 30 U *Eco*RV und 5 μ l 1-4 inoculation buffer versetzt und auf 50 μ l mit sterilem destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Ansätze werden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend das Enzym durch eine Erhitzung für 20 Minuten bei 80°C inaktiviert. Von der Spaltung wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.16).

Um die Gefahr einer Religation des Plasmids zu vermeiden, wird dieses durch eine 30-minütige Behandlung mit 1,5 U CIAP bei 37°C dephosphoryliert und das Enzym durch eine 15-minütige Inkubation bei 85°C inaktiviert.

Aufreinigung der gespaltenen genomischen DNA siehe 2.15

Ligation der gespaltenen genomischen DNA mit pBluescript SK

Material:

gespaltene aufgereinigte genomische DNA der *P. fluorescens* A506-Mutanten

pBluescript SK, gespalten

10 x Ligationspuffer, Fermentas (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8)

50% PEG 4000, steril

T4 DNA-Ligase (1 U/μl), Fermentas

steriles destilliertes Wasser

Durchführung:

9 μl aus dem Ansatz mit der gespaltenen, aufgereinigten genomischen DNA werden mit 3 μl aus dem Ansatz mit gespaltenem pBluescript SK, 2 μl 10 x Ligationspuffer, 2 μl 50% PEG und 5 U T4 DNA-Ligase versetzt und mit sterilem destilliertem Wasser auf 20 μl aufgefüllt. Die Ansätze werden über Nacht bei 4°C inkubiert, das Enzym durch Erhitzen für 10 Minuten bei 70°C inaktiviert und die Ansätze anschließend zur Transformation eingesetzt (jeweils 4 μl).

Transformation der Ligation siehe 2.6

Kanamycin-resistente Transformanden werden gepickt, in LB-Medium über Nacht angezogen und die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.12). Von der Präparation wird eine Agarose-Gelelektrophorese angefertigt (siehe 2.16).

Spaltung der Plasmid-Präparation

Isolierte Plasmide werden mit *EcoRV* gespalten, wie es auch für die Spaltung der genomischen DNA zuvor beschrieben worden ist, um die Insertgröße abschätzen zu können. Die Spaltung wird auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.16).

Sequenzierung der Inserts

Die Konzentration der Plasmid-DNA mit Fragmenten genomischer DNA von *P. fluorescens* A506, die den Integrationsort der Mutagenese mit dem *nptII* Gen beinhalten, wird photometrisch bestimmt (siehe 2.14) und jeweils 2 μg zum Sequenzieren eingeschickt.

Die Sequenz-Reaktion erfolgt mit dem Primer

o-end-up-fwd 5'ATGCAAGCTTCGGCCGCCTA 3'

der ausgehend vom O-End, einer der Erkennungsseiten der Transposase, die zusammen mit dem *nptII*-Gen ins Genom integriert worden ist, heraus sequenziert. Pro Probe werden 20 pMol Primer mit eingeschickt.

Die Sequenzierung erfolgte durch Seqlab Sequence Laboratories in Göttingen.

2.11.2 Detektion des Integrationsortes des Transposons bei *P. fluorescens* Bk3-Mutanten

Isolierung genomischer DNA aus *P. fluorescens* Bk3 siehe 2.13.2

Restriktionsenzymspaltung der genomischen DNA

Material:

genomische DNA der *P. fluorescens* Bk3-Mutanten

FastDigest® *Bgl*II (1 FDU/μl) von Fermentas

10 x FastDigest® Puffer von Fermentas

0,5 M EDTA (in destilliertem Wasser, pH 8,0)

steriles destilliertes Wasser

Heizblock (37°C)

Durchführung:

Ca 10 μg genomische DNA werden mit 3 FDU *Bgl*II und 3 μl 10 x Fast Digest Puffer versetzt und mit Wasser auf 30 μl aufgefüllt. Die Ansätze werden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und jeweils 5 μl zur Kontrolle der Spaltung auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.16). Die Enzymreaktion wird anschließend durch Zugabe von 20 mM EDTA (pH 8,0) gestoppt.

Aufreinigung der gespaltenen genomischen DNA siehe 2.15

Die aufgereinigte gespaltene genomische DNA wird in 15 μl sterilem destilliertem Wasser aufgenommen.

Religation der gespaltenen genomischen DNA von den *P. fluorescens* Bk3-Mutanten

Material:

Aufgereinigte gespaltene genomische DNA *P. fluorescens* Bk3-Mutanten

T4 DNA-Ligase (1 U/μl) von Fermentas

10 x Ligationspuffer von Fermentas (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8)

steriles destilliertes Wasser

Heizblock (70°C)

Durchführung:

15 μl aus der aufgereinigten Spaltung werden mit 5 U T4 DNA-Ligase und 2 μl 10 x Ligationspuffer versetzt und mit Wasser auf 20 μl aufgefüllt. Die Ansätze werden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend das Enzym für 10 Minuten bei 70°C inaktiviert. Jeweils 4 μl werden zur Transformation eingesetzt.

Transformation der Ligation siehe 2.6

Kanamycin-resistente Transformanden werden gepickt, in LB-Medium über Nacht angezogen und die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.12). Von der Präparation wird eine Agarose-Gelelektrophorese angefertigt (siehe 2.16).

Sequenzierung der Inserts

Die Konzentration der Plasmid-DNA mit Fragmenten genomischer DNA von *P. fluorescens* Bk3, die den Integrationsort der Mutagenese mit dem *nptII* Gen beinhalten, wird photometrisch bestimmt (siehe 2.14) und jeweils 500 ng zum Sequenzieren eingeschickt.

Die Sequenz-Reaktion erfolgt mit den vom Integrationsort der Mutation auswärts gerichteten Primern:

tpnRL17 5' AACAAGCCAGGGATGTAACG 3'

und

tpnRL13 5' CAGCAACACCTTCTTCACGA 3'

die an das *oriR6K* und das *nptII*-Ende binden. Pro Probe werden jeweils 20 pMol Primer mit zugegeben und die Ansätze auf 10 µl mit sterilem destilliertem Wasser aufgefüllt.

Die Sequenzierung erfolgte durch SEQLAB Sequence Laboratories in Göttingen.

2.12 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien

Die nachfolgenden drei Methoden beschreiben die Isolation von Plasmiden aus Bakterien-Kulturen über alkalische Lyse. Hierbei wird die Bakterienzellwand durch SDS und NaOH denaturiert; die Zugabe von NaOH führt zudem zur Denaturierung der Plasmid- und genomischen DNA. Durch Zugabe von Kalium-Acetat werden die Plasmide wieder renaturiert und die Proteine ausgefällt; die genomische DNA, assoziiert an die Zellmembran, renaturiert aber nicht. Sie kann zusammen mit den anderen Zellbestandteilen abzentrifugiert und damit von den Plasmiden abgetrennt werden. Die Plasmid-DNA wird durch Zugabe von Alkohol (Isopropanol oder Ethanol) ausgefällt; bei dem verwendeten Kit kann sie anschließend durch Adsorption an eine Silikamembran besonders sorgfältig von Proteinen abgetrennt werden.

2.12.1 Isolierung von Plasmid-DNA über alkalische Lyse (nach Ish-Horowitz & Burke, 1981)

Material:

Lösung 1-3 für die alkalische Lyse:

| <i>Lösung 1</i> | <i>Lösung 2</i> | <i>Lösung 3</i> |
|-----------------------|-----------------|-----------------------------|
| 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 | 200 mM NaOH | 2,55 M Kalium-Acetat pH 4,8 |
| 10 mM EDTA | 1% SDS | |

Lösung 1-3 werden autoklaviert.

5 ml-Röhrchen mit LB-Medium (siehe 2.1)

Ampicillin, 100 mg/ml (Amp¹⁰⁰), Kanamycin, 50 mg/ml (Kan⁵⁰)

Schüttelinkubator, 37°C

Isopropanol (absolut)

Ethanol (70%), eiskalt

Steriles destilliertes Wasser

Zentrifuge Jouan CR3i von Jouan Industries S.A.S.

SpeedVac Concentrator plus von Eppendorf

Eis

Durchführung:

Von einer Agarplatte mit Transformanden werden mittels einer Pipettenspitze Kolonien gepickt und 5 ml LB-Röhrchen (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion) angeimpft. Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert.

Alle folgenden Zentrifugationsschritte werden bei 10.000 x g durchgeführt.

4 ml der Übernachtskultur werden für 3 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl Lösung 1 aufgenommen.

Nach Zugabe von 300 µl Lösung 2 werden die Proben invertiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden 300 µl von Lösung 3 zugegeben, die Proben invertiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten.

400 µl des Überstandes werden mit dem 1,7-fachen Volumen an Isopropanol versetzt und gevortext, danach für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% eiskaltem Ethanol gewaschen, anschließend für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen, das Pellet für 5 Minuten in der SpeedVac getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

Mit den isolierten Plasmiden wird zur Kontrolle eine Elektrophorese (2.16) durchgeführt.

2.12.2 Aufreinigung von Plasmiden mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit von Fermentas

Material:

10 ml Röhrchen mit LB-Medium (siehe 2.1)

Kanamycin, 50 mg/ml (Kan⁵⁰)

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit von Fermentas (beinhaltet Resuspensionslösung, Lysispuffer, Neutralisierungslösung, Waschpuffer, RNase A, Spin Columns, Collection Tubes)

Schüttelinkubator, 37°C, Zentrifuge Jouan CR3i von Jouan Industries S.A.S.

Durchführung:

Von einer Agarplatte mit Transformanden werden mittels einer Pipettenspitze Kolonien gepickt und 5 ml LB-Röhrchen (versetzt mit Kanamycin, 50 µg/ml) angeimpft. Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert.

2 x 2 ml Übernachtskultur werden in 2 ml Eppendorfgefäßen bei 8000 x g abzentrifugiert.

Die Isolierung der Plasmide aus dem Zellpellet wird nach dem Skript des Herstellers durchgeführt.

Die isolierten Plasmide werden in 50 µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle wird eine Agarose-Gelelektrophorese (2.16) durchgeführt.

2.13 Isolierung von genomischer DNA aus den *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3-Mutanten

Für die Bestimmung des Integrationsortes der Mutation bei den *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3-Mutanten wird die genomische DNA der Mutanten benötigt.

Die Zellen werden bei beiden angewendeten Methoden zunächst enzymatisch aufgeschlossen und die genomische DNA anschließend entweder über Phenol-Chloroform-Extraktionen oder, bei dem eingesetzten Kit, über eine Säulenmatrix von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt und aufgereinigt.

Die isolierte genomische DNA wird dann, wie unter 2.11 beschrieben, subkloniert und für Transformationen eingesetzt.

2.13.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *P. fluorescens* A506 (Phenol-Chloroform-Extraktion)

Material:

Mutanten von *P. fluorescens* A506 (Mutagenese siehe 2.10.1)

Erlenmeyerkolben mit 40 ml LB-Medium (siehe 2.1)

gesättigte NaI-Lösung (in destilliertem Wasser)

50 mM TrisCl pH 8,0, 50 mM EDTA

30 mM TrisCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 2% N-Lauryl-Sarkosyl
 RNase (DNase-frei, 10 mg/ml)
 Phenol/Chloroform (1:1, pH 8,0)
 Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
 Isopropanol (absolut)
 Ethanol (70%)
 TE-Puffer pH 8,0, mit 1 mM EDTA
 Lysozym (min. 20.000 U/mg bei pH 6,2) von AppliChem
 Steriles destilliertes Wasser
 flüssiger Stickstoff
 Schüttelinkubator, 28°C, Zentrifuge Jouan CR3i von Jouan Industries S.A.S.

Durchführung:

Von Agarplatten mit den Mutanten werden mittels einer Pipettenspitze Kolonien gepickt und in 40 ml LB-Medium (mit 50 µg Kanamycin/ml) überführt. Die Kulturen werden über Nacht bei 28°C im Schüttelinkubator inkubiert.

Die Übernachtskulturen der Bakterienstämme werden für fünf Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert.

Der Überstand der Kulturen wird verworfen, pro ml Pellet werden 2 ml gesättigte NaI-Lösung zugegeben.

Jeder Ansatz wird für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend mit sterilem destilliertem Wasser auf 30 ml aufgefüllt.

Es folgt ein Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 8000 x g.

Die Pellets werden in 3 ml 50 mM TrisCl pH 8,0, 50 mM EDTA aufgenommen, in ein 50 ml Sarstedtröhrchen überführt, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei sie mehrfach in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

Nach diesem Inkubationsschritt werden 3 ml 30 mM TrisCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 2% N-Lauryl-Sarkosyl und 2 µl RNase zugegeben und die Ansätze für 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Ansätze werden in 1 ml Aliquots auf 2 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt, pro Eppendorfgefäß 600 µl Phenol/Chloroform (1:1, pH 8,0) zugegeben und gemischt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für zehn Minuten bei 12.000 x g.

Die Überstände werden erneut mit 600 µl Phenol/Chloroform (1:1, pH 8,0) versetzt und gemischt und wie vorangegangen zentrifugiert.

Anschließend werden die Überstände abgezogen und 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Nach Invertieren der Reaktionsgefäße wird für zehn Minuten bei 12000 x g zentrifugiert.

Jeder daraus resultierende Überstand wird mit einer abgeschnittenen Spitze abgezogen, mit der gleichen Menge an Isopropanol versetzt und für 30 Minuten bei 12000 x g und 4°C abzentrifugiert.

Die Pellets werden mit 1 ml 70% Ethanol mit einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 12000 x g und 4°C gewaschen und anschließend, nach Entfernen des Überstandes, bei 60°C getrocknet.

Zuletzt erfolgt unter Erwärmung auf 50°C eine Aufnahme der Pellets in 100 µl TE-Puffer. Die genomische DNA wird bei -20°C gelagert und es wird eine Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle durchgeführt (siehe 2.16).

2.13.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus *P. fluorescens* Bk3 mit dem peqGOLD Bacterial DNA Kit von Peqlab

Material:

5 ml LB-Röhrchen (siehe 2.1)

Mutanten von *P. fluorescens* Bk3 (Mutagenese siehe 2.10.2)

peqGOLD Bacterial DNA Kit von Peqlab (enthält: PerfectBind DNA Columns, 2.0 ml Collection Tubes, DNA Lysis Buffer T, DNA Binding Buffer, DNA Wash Buffer, Elution Buffer, 10 mM TE Buffer, RNase A [20 mg/ml], Lysozym [10 mg/ml], Proteinase K [20 mg/ml])

Steriles destilliertes Wasser

Schüttelinkubator, 28°C, Zentrifuge Jouan CR3i von Jouan Industries S.A.S.

Wasserbad, 30°C, Schüttelwasserbad, 70°C

Durchführung:

Von einer Agarplatte mit den Mutanten werden mittels einer Pipettenspitze Kolonien gepickt und jeweils 5 ml LB-Medium (mit 50 µg Kanamycin/ml) angeimpft. Die Kulturen werden über Nacht bei 28°C im Schüttelinkubator inkubiert.

2 ml der Übernachtskulturen werden für 10 Minuten bei 4.000 x g pelletiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und verworfen.

Die Isolierung der genomischen DNA aus den Zellen wird nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die genomische DNA wird in 100 µl sterilem destilliertem Wasser gelöst, bei -20°C gelagert und es wird eine Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle durchgeführt (siehe 2.16).

2.14 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren mit der TrayCell

Material:

Proben: Plasmid-DNA (2.12) und genomische DNA (2.13)

Wasser

TrayCell von Hellma mit Deckel für 0,2 mm Schichtdicke

Photometer Beckman Coulter UV-DU 7500 von Beckman Coulter GmbH

Durchführung:

Als Probenvolumen werden 1 µl der isolierten genomischen DNA oder Plasmid-DNA verwendet, auf die TrayCell-Küvette aufgetragen und die optische Dichte bei 260 nm gemessen.

Die Konzentration (ng/µl) errechnet sich aus der Absorption (260 nm) mal dem Faktor, wobei sich der Faktor aus dem probenspezifischen Faktor (50 für doppelsträngige DNA) x dem virtuellen Verdünnungsfaktor (50 bei einer Schichtdicke von 0,2 mm) zusammensetzt. Das ergibt:

$$\text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = \text{Absorption (260 nm)} \times 2500$$

Der Abgleich erfolgt mit Wasser.

2.15 Aufreinigung gespaltener genomischer DNA mit dem peqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kit von Peqlab

Material:

Spaltung der genomischen DNA der *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3-Mutanten aus 2.11.1 und 2.11.2

peqGOLD MicroSpin Cycle Pure Kit von Peqlab (enthält PerfectBind MicroSpin DNA-Säulen, 2 ml Sammel-Tubes, CP-Puffer, DNA Elutionspuffer)

Zentrifuge Jouan CR3i von Jouan Industries S.A.S.

Durchführung:

Die Aufreinigung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers des Kits. Nach Aufreinigung wird die gespaltene genomische DNA in 15 µl Elutionspuffer aufgenommen.

2.16 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Das Gel besteht aus langen Agarosepolymeren, die durch Vernetzung untereinander ein Porensystem bilden. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kompakter liegen die einzelnen Gelpartikel vor. Damit funktioniert diese Elektrophorese wie ein Sieb für Moleküle: Je größer die Moleküle sind, desto langsamer wandern sie bei Anlegen eines elektrischen Feldes durch das Gel. Durch das Phosphatrückrad der DNA erfährt diese eine negative Nettoladung; aus diesem Grund bewegt sich DNA im elektrischen Feld zum Pluspol.

Material:

Proben aus 2.9, 2.11-2.13

Marker: Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder und λ -DNA HindIII Marker von Fermentas

2 x Ladepuffer

100 μ l Bromphenolblau/Xylencyanollösung (je 250 mg/ 90 ml Wasser)

400 μ l Glycerin (87%)

500 μ l 1 x TAE

50 x TAE (Tris-EDTA-Puffer)

2 M Tris

0,5 M Natrium-Acetat

50 mM EDTA

Einstellen mit Eisessig auf pH 7,8

1 x TAE: 1:50-Verdünnung von 50 x TAE mit destilliertem Wasser

Agarose

Ethidiumbromidbad (0,05% in 1 x TAE)

UV-Tisch mit Gel Doc 1000 von Bio-Rad.

Durchführung:

Für ein 1%iges Gel (für Plasmide und Restriktionsenzymsspaltungen) werden 0,8 g Agarose in 80 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht und in einen Gel-Schlitten gegossen. Für ein 0,8%iges Gel (für genomische DNA) werden 0,8 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht und in einen Gel-Schlitten gegossen.

Nach Erstarren des Gels werden etwa 1 μ g DNA mit der entsprechenden Menge des 2 x Ladepuffers versetzt und auf das Gel aufgetragen. Von den Markern Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder und λ -DNA HindIII Marker werden jeweils 5 μ l verwendet. Die Elektrophoresedauer beträgt 50-60 Minuten bei 80 Volt; das Gel wird anschließend für 30 Minuten im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die Auswertung erfolgt auf dem UV-Tisch mit Gel Doc 1000 von Bio-Rad.

2.17 Aufnahme von Wachstumskurven

Im Rahmen dieser Arbeit werden von Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE Wachstumskurven in einem Vollmedium (LB) und einem Minimalmedium (M9) unter Angebot verschiedener zusätzlicher Stickstoffquellen aufgenommen, um Unterschiede im Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme herausstellen zu können.

Die Aufnahme der Wachstumskurven erfolgt durch eine zu bestimmten Zeitpunkten stattfindende Messung der optischen Dichte bei 600 nm mit dem Photometer.

Zusätzlich werden Wachstumskurven mit einer parallelen Messung der Biolumineszenz des autolumineszenten *E. amylovora*-Stammes 222::TnluxCDABE in An- und Abwesenheit des Wildtyps und der biolumineszenten Stämme von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (::TngfpluxAB) aufgenommen, um eine Aussage über den Stoffwechselstatus der Bakterien zu den jeweiligen Messpunkten treffen zu können.

2.17.1 Aufnahme von Wachstumskurven mit den Wildtypen und Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, sowie von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE

Material:

Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (Generierung der Mutanten siehe 2.10)

E. amylovora 222::TnluxCDABE

LB-Medium (siehe 2.1)

Alle Komponenten für M9-Medium (Aldridge et al., 1997) (siehe 2.1)

steriles destilliertes Wasser

1 x Küvetten (Schichtdicke 1 cm)

Kulturschüttler (28°C)

Photometer Beckman Coulter UV-DU 7500 von Beckman Coulter GmbH

Durchführung:

Alle oben aufgeführten Bakterienstämme werden über Nacht bei 28°C in LB Medium angezogen.

Die Wachstumskurven werden für die einzelnen Stämme in folgenden Medien aufgenommen:

- 50 ml LB-Medium
- 50 ml M9-Medium mit 20 mM Hepes pH 7,0, 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose
- 50 ml M9-Medium mit 20 mM Hepes pH 7,0 und 10 mM Asparagin
- 50 ml M9-Medium mit 20 mM Hepes pH 7,0, 5 mM NaNO₃ und 0,5% Glukose
- 50 ml M9-Medium mit 20 mM Hepes pH 7,0, 0,5% Glukose und jeweils 10 mM der Aminosäuren Methionin, Glycin, Prolin, Arginin oder Asparaginsäure (nur für *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie Mutante #8-42 von *P. fluorescens* A506)

Die aufgeführten Medien werden mit den Übernachtskulturen der einzelnen Stämme angeimpft. Die optische Dichte angeimpfter Medien bei 600 nm sollte zur Stunde null 0,1-0,2 betragen. Anschließend werden die Ansätze bei 28°C inkubiert und die OD₆₀₀ in regelmäßigen Abständen alle ein bis zwei Stunden bis 10 Stunden nach Animpfen, dann noch nach 24, 32 und 48 Stunden gemessen. Die Ergebnisse werden mit Excel 2000 bearbeitet.

2.17.2 Aufnahme von Wachstumskurven mit gleichzeitiger Biolumineszenzmessung

Material:

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 sowie *P. fluorescens* A506::TngfpluxAB und *P. fluorescens* Bk3::TngfpluxAB

E. amylovora und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE

LB-Medium (je 50 ml pro Versuchsansatz), siehe 2.1

2 % Decanal (in 96% Ethanol)

1 x Küvetten (Schichtdicke 1 cm)

Kulturschüttler (28°C)

Photometer Beckman Coulter UV-DU 7500 von Beckman Coulter GmbH

Luminometer Junior von Berthold Technologies

Durchführung:

Alle oben aufgeführten Bakterienstämme werden über Nacht bei 28°C in LB Medium angezogen.

Das LB-Medium wird mit je 2×10^9 Zellen aus den Übernachtskulturen der einzelnen Stämme angeimpft. Jeder Stamm wird einzeln kultiviert, der Wildtyp von *E. amylovora* zusätzlich mit gleicher Zellzahl von *P. fluorescens* A506::TngfpluxAB oder *P. fluorescens* Bk3::TngfpluxAB, bzw. *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zusätzlich mit dem Wildtyp von *P. fluorescens* A506 oder Bk3.

Anschließend werden die Ansätze bei 28°C inkubiert und die OD₆₀₀ nach null und zwei Stunden, danach in regelmäßigen Abständen jede Stunde bis zehn Stunden nach Animpfen, sowie zusätzlich nach 24 Stunden gemessen.

Gleichzeitig wird die Biolumineszenz in 50 µl der Proben mit dem Bioluminometer aufgenommen. Zu Ansätzen, die *P. fluorescens* A506::TngfpluxAB oder *P. fluorescens* Bk3::TngfpluxAB beinhalten, wird zuvor 5 µl 2% Decanal zugegeben. Die Zeit zur Aufnahme der Biolumineszenz beträgt 30 Sekunden. Die Ergebnisse werden mit Excel 2000 bearbeitet.

2.18 Herstellung von Wachstumsüberständen

Im Rahmen dieser Arbeit werden zu unterschiedlichen Zwecken Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 oder *E. amylovora* 222::TnluxCDABE benötigt:

- Für Vorinkubations- und Hemmhoftests von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 (2.22 und 2.23),
- für eindimensionale Gele der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 (2.21),

- für 2D-Gele der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (Wildtyp und in dieser Arbeit erstellte Mutanten, 2.21),
- für 2D-Gele der Wachstumsüberstände von Co-Kulturen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, bzw. Wachstumsüberstände von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (2.21)
- und für Gelfiltrationen der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände (2.24)

Material:

Erlenmeyer-Kolben mit je 50 ml M9-Medium (siehe 2.1)

- für die Anzucht von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose, optional mit 0,5 mM CaCl₂
- für die Anzucht von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 mit 10 mM Asparagin und 2% Glukose.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 (Wildtyp und in dieser Arbeit erstellte Mutanten)

A. pullulans CF10 und CF40

E. amylovora 222::TnluxCDABE

Vivaspin 20 Ankonzentratoren, cut off 5 kDa von Sartorius

Rotilabo Spritzenfilter, 0,22 µm von Roth

ZelluTrans Dialyseschläuche, Wandstärke 25 µm, Breite 19 mm, MWCO 4000-6000 kDa von Roth

20 mM Hepes pH 7,0

Kulturschüttler, 28°C

Zentrifuge Jouan CR3i von Jouan Industries S.A.S.

Durchführung:

Die oben aufgeführten Bakterien- und Hefestämme werden von Agarplatten gepickt und jeweils 50 ml M9-Medium angeimpft. Die Anzucht erfolgt für drei Tage bei 28°C im Kulturschüttler.

Anschließend werden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (20 Minuten, 8000 x g) abzentrifugiert und der Überstand steril filtriert. Der Überstand wird mit den Ankonzentratoren auf ca. 5 ml durch Zentrifugation bei 4°C und 8000 x g eingengt. Der Durchlauf (niedermolekulare Fraktion ohne Proteine), der nur noch Moleküle, die kleiner als 5 kDa sind, beinhaltet, wird bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die hochmolekulare Fraktion (mit Molekülen größer als 5 kDa) wird über Nacht gegen zwei Liter 20 mM Hepes (pH 7,0) dialysiert. Der Dialysepuffer wird in dieser Zeit zweimal ausgetauscht.

Anschließend wird die hochmolekulare Fraktion des Wachstumsüberstandes mit den Ankonzentratoren durch Zentrifugation bei 4°C und 8000 x g auf ca. 150 µl eingengt und ebenfalls bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Sowohl mit Überstand als auch mit Durchfluss wird eine Bradford-Proteinbestimmung (siehe 2.20) durchgeführt.

2.19 Isolierung von Periplasma

Der periplasmatische Raum ist ein Zellkompartiment zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran Gram-negativer Bakterien, der bis zu 40% des Zellvolumens ausmachen kann. Die Matrix in diesem Raum wird als Periplasma bezeichnet und besteht aus Enzymen sowie Binde- und Transportproteinen, die in verschiedene biochemische Prozesse eingebunden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wird mittels Vorinkubationsversuchen untersucht, inwieweit Proteine des Periplasmas von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 eine inhibitorische Wirkung auf den Feuerbranderreger ausüben.

Material:

Erlenmeyerkolben mit 250 ml LB-Medium (siehe 2.1)

P. fluorescens A506 bzw. Bk3

30 mM Kalium-Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 40% Saccharose

5 mM Kalium-Phosphatpuffer (pH 7,0), 4°C

Vivaspin 20, Ankonzentratoren, cut off 5 kDa von Sartorius

Hämatokritröhrchen

Kulturschüttler (28°C, Raumtemperatur)

Zentrifugen: Sorvall RC-SB Refrigerated Superspeed Centrifuge von Du Pont Instrument und Jouan CR3i von Jouan Industries, S.A.S.

Durchführung:

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 werden von einer Agarplatte gepickt, in 250 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 28°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Zelldichte der Übernachtskultur werden 5 ml Kultur in Hämatokritröhrchen für 15 Minuten bei 4000 x g abzentrifugiert und die Zelldichte abgelesen. Die übrige Kultur wird 15 Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert, das Pellet in 30 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0 mit 40% Saccharose aufgenommen und dabei die Zelldichte auf 100 µl Zellen/ml eingestellt.

Die Zellsuspension wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert, für 10 Minuten bei 6000 x g abzentrifugiert und anschließend das Zellpellet in 5 mM eiskaltem Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,0, aufgenommen. Hierbei wird die Zelldichte auf 200 µl Zellen/ml eingestellt und die Suspension für 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Die Zellen werden für 10 Minuten bei 8000 x g abzentrifugiert; der Überstand enthält die Periplasmafraktion.

Das Periplasma wird mit Ankonzentratoren durch Zentrifugation bei 8000 x g auf ein Endvolumen des hochmolekularen Überstandes von ca. 150 µl ankonzentriert und sowohl der hochmolekulare Überstand als auch der niedermolekulare Durchfluss bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Sowohl mit Überstand als auch mit Durchfluss werden eine Bradford-Proteinbestimmung (siehe 2.20), eine Tris-Tricin-Gelelektrophorese (siehe 2.21) sowie Vorinkubationsversuche (siehe 2.22) durchgeführt.

2.20 Bradford-Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

Der Bradford-Test ist eine empfindliche photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen.

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) bildet dabei in saurer Lösung Komplexe mit kationischen und hydrophoben Seitenketten der Proteine. Das Absorptionsspektrum der ungebundenen Form von Coomassie-Brilliant-Blau hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Nach Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen anionischen Form stabilisiert und das Absorptionsspektrum verschiebt sich auf ein Maximum bei 595 nm.

Material:

Proteinproben (Wachstumsüberstände und Periplasma aus 2.18 und 2.19)

Bradford-Reagenz

100 mg Coomassie-Brilliant-Blue G-250 werden in 50 ml 96%igem Ethanol gelöst, 100 ml Phosphorsäure zugegeben und ad. 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Das Reagenz wird durch einen Faltenfilter in eine braune Flasche gefüllt.

BSA (1 µg/µl in destilliertem Wasser)

destilliertes Wasser

Photometer Beckman Coulter UV-DU 7500 von Beckman Coulter GmbH

Durchführung:

5 µl der Proteinprobe werden mit 95 µl destilliertem Wasser und 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Dunkeln wird die OD bei 595 nm gemessen.

Zusätzlich wird eine Eichgerade mit 0, 5, 10, 15, 20 und 25 µg BSA angefertigt, anhand derer die Proteinkonzentration der eingesetzten Proben berechnet werden kann.

2.21 1D und 2D-Gelelektrophorese und Färbemethoden für Proteingele

Die SDS-PAGE (Abkürzung für *engl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Methode zur Trennung von Proteingemischen in einem elektrischen Feld. Als Trennmedium dient ein Gel auf Polyacrylamid-Basis. Zusätzlich kommt SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Einsatz, was die Eigenladung von Proteinen überdeckt, ihnen eine negative Nettoladung verleiht und zudem unter Hitzeeinwirkung zur Aufhebung von Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen führt.

Anschließend werden die Proteinproben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und eine elektrische Spannung angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel bewirkt. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Poren des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern.

Wenn eine genauere Auftrennung der Proteine nötig ist, kann neben einer Auftrennung der Proteine nach Größe noch im Vorfeld eine Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt (IEF) erfolgen. Die Proteine werden hierfür auf einen immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) aufgetragen und eine Spannung angelegt. Diesem System ausgesetzt, wandern die Proteine zu dem pH hin, an dem ihre Nettoladung Null ist. Das elektrische Feld konzentriert die Proteine also an ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt.

Die anschließende Färbung der Gele erfolgt mit Coomassie oder Silber.

2.21.1 Isoelektrische Fokussierung

Material:

Proteinproben aus 2.18

Lösungen und Puffer für die isoelektrische Fokussierung

Lysis-Puffer

8 M Harnstoff, 65 mM CHAPS und 39 mM Tris werden in destilliertem Wasser gelöst.

1 ml Aliquots werden bei -20°C eingefroren, vor Benutzung werden zu 1 ml Lysispuffer 100 μl 1 M DTT und 10 μl Biolyte 3-10 von Bio-Rad zugegeben.

Rehydratationslösung

8 M Harnstoff, 33 mM CHAPS und eine Spatelspitze Bromphenolblau werden in destilliertem Wasser gelöst.

1 ml Aliquots werden bei -20°C eingefroren, vor Benutzung werden zu 1 ml Lösung 18 μl 1 M DTT und 5 μl Biolyte 3-10 von Bio-Rad zugegeben.

Equilibrierungslösung

50 mM Tris-Cl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 345 ml 87% Glycerol, 70 mM SDS und eine Spatelspitze Bromphenolblau werden in destilliertem Wasser gelöst.

10 ml Aliquots werden bei -20°C eingefroren, vor Benutzung werden zu 10 ml 100 mg DTT zugegeben (später zu 5 ml 125 mg Jodacetamid).

1 x Gelpuffer

1 M Tris pH 8,45 und 3 mM SDS werden in destilliertem Wasser gelöst

DTT und Jodacetamid

IPG-Streifen, pH-Range von pH 3-10 von Bio-Rad

Mineralöl von Sigma

Rehydrationskammer, Filterpapierstreifen, Kammer für isoelektrische Fokussierung, Fokussierungsgerät Protean IEF Cell, alle Produkte von Bio-Rad

Durchführung:

Für Gele mit späterer Silberfärbung werden 150 µg Protein in einem Endvolumen von 20 µl mit 45 µl Lysispuffer versetzt. Für Gele mit späterer Coomassie-Colloidal-Färbung werden 450 µg Protein in einem Endvolumen von 20 µl mit 45 µl Lysispuffer versetzt. Die Ansätze werden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zu den Ansätzen werden 135 µl Rehydrationslösung zugegeben, 200 µl in die Rehydrationskammer pipettiert, ein IPG Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei aufgelegt und mit 1,5 ml Mineralöl überschichtet. Die Streifen werden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die Streifen entnommen, abgetropft und in die IEF-Kammer eingelegt, so dass die Enden des Streifens jeweils auf angefeuchteten Filterpapierstreifen über den Elektroden liegen. Jeder Streifen wird mit 1 ml Mineralöl überschichtet.

Das Fokussierungsprogramm in der Protean IEF Cell besteht aus 12 h Rehydratation (ohne Anlegen einer Spannung), 20 Minuten bei 250 V, 2,5 h bei 6000 V und 40000 Vh bei 6000 V (jeweils 20 µA pro IPG-Streifen).

Nach der Fokussierung werden die IPG-Streifen für 15 Minuten in der Rehydrationskammer in 4 ml Equilibrierungslösung mit 40 µg DTT, dann für 15 Minuten in 4 ml Equilibrierungslösung mit 40 µg DTT und 100 µg Jodacetamid inkubiert.

Anschließend werden die IPG-Streifen mit 1 x Gelpuffer gespült und auf ein 9%iges Tris-Tricin-Gel ohne Sammelgel aufgelegt (siehe 2.21.2).

2.21.2 Tris-Tricin Gelelektrophorese (nach Schägger und von Jagow, 1987)

Material:

Proteinproben aus 2.18 und 2.19, IPG-Streifen aus 2.21.1

Lösungen und Puffer für die Tris-Tricin Gelelektrophorese

3 x Gelpuffer

3 M Tris und 9 mM SDS werden in destilliertem Wasser gelöst und mit HCl auf pH 8,45 eingestellt.

10 x Anodenpuffer

2 M Tris werden in destilliertem Wasser gelöst und mit HCl auf pH 8,9 eingestellt. Der Puffer wird zur Verwendung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

10 x Kathodenpuffer

1 M Tris, 1 M Tricin und 35 mM SDS werden in destilliertem Wasser gelöst und mit HCl auf pH 8,25 eingestellt. Der Puffer wird zur Verwendung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

2 x Probenpuffer

620 µl 1 M Tris pH 6,8, 1 ml 87% Glycerin, 500 µl 2-Mercaptoethanol, 2,5 ml 20% SDS und 10 µl 10% Serva Blue G werden miteinander vermischt.

40% Acrylamid/1,6% N,N-Bisacrylamid in destilliertem Wasser

TEMED

10% APS (Ammoniumpersulfat; in destilliertem Wasser)

87% Glycerin

destilliertes Wasser

Gelträger (10 x 10 cm für 1D-Proteingele, 15 x 15 cm für 2D-Gele)

Durchführung:

Für 16 ml eines 9%igen Trenngels werden 5 ml 3 x Gelpuffer, 2 ml Glycerin, 3,4 ml 40% Acrylamid/1,6% N,N-Bisacrylamid, 5,35 ml destilliertes Wasser, 7,5 µl TEMED und 75 µl 10%iges APS miteinander vermischt und in einen Gelträger gegossen.

Nach Auspolymerisieren des Gels wird für 1D-Gele ein 3%iges Sammelgel erstellt, das aus 1,6 ml 3 x Gelpuffer, 650 µl 30% Acrylamid/0,8% N,N-Bisacrylamid, 3,5 ml destilliertem Wasser, 4 µl TEMED und 40 µl APS besteht. Das Trenngel wird mit dem Sammelgel überschichtet und Gelkämme eingesteckt; nach Erstarren des Sammelgels kann das Auftragen der Proteinproben erfolgen.

Auf Gele für 2D-Elektrophoresen wird der vorbehandelte IPG-Streifen (siehe 2.21.1) aufgelegt und mit 1% Agarose (in 1 x Gelpuffer, 1:3-Verdünnung aus 3 x Gelpuffer mit destilliertem Wasser) überschichtet. Hierbei wird ein kleiner Spacer eingebracht, um später einen Proteinmarker auftragen zu können.

Für 1D-Gele, die später Coomassie-gefärbt werden sollen, werden pro Spur 10 µg Protein aufgetragen, für 1D-Gele, die Silber-gefärbt werden sollen, 5 µg Protein pro Spur.

Die Proteinproben werden entsprechend ihres Volumens mit demselben Volumen an 2 x Protein-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Nach Auskühlen werden die Proben auf das Gel aufgetragen und bis zum Erreichen des Sammelgels bei 15 mA pro Gel laufen gelassen. Beim Eintritt in das Trenngel wird die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht.

Für 2D-Gele erfolgt der Gellauf für 2 Stunden bei 75 mA pro Gel.

Die Gele werden nach erfolgtem Gellauf Coomassie- oder Silber-gefärbt (siehe 2.21.3-2.21.5).

2.21.3 Coomassie-Färbung (nach Meyer und Lamberg, 1965)

Material:

Proteingele aus 2.21.2

Coomassie-Färbelösung

1 % Coomassie-Brilliant-Blue R-250 (w/v) werden in Methanol (40% v/v) und Eisessig (10% v/v) gelöst, dann mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Coomassie-Entfärbelösung

40% Ethanol und 10% Eisessig werden mit destilliertem Wasser versetzt.

Färbeschale

Durchführung:

Proteingele werden für etwa eine Stunde in Coomassie-Färbelösung geschwenkt.

Nach dem Abgießen der Färbelösung werden die Gele mehrfach mit Entfärbelösung gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind.

2.21.4 Coomassie-Colloidal-Färbung (nach Neuhoff et al., 1988)

Material:

Proteingele aus 2.21.2

Lösungen für Coomassie-Colloidal Färbung

Lösung A

2 % *ortho*-Phosphorsäure (v/v) und 10% Ammoniumsulfat (w/v) werden in destilliertem Wasser gelöst.

Lösung B

5 % Coomassie-Brilliant-Blue G250 (w/v) werden destilliertem Wasser gelöst.

Färbelösung

Die Färbelösung besteht aus 98% Lösung A und 2% Lösung B, die über Nacht geschüttelt werden. Vor der Färbung wird Methanol im Verhältnis 1:4 zur Färbelösung gegeben.

Fixierer

40% Methanol und 10% Essigsäure in destilliertem Wasser.

destilliertes Wasser

Färbeschale

Durchführung:

Nach dem Gellauf wird das Gel für eine Stunde in der Fixierungslösung geschwenkt, anschließend über Nacht unter Schwenken in der Färbelösung inkubiert.

Die Entfärbung des Gels erfolgt durch Waschen mit destilliertem Wasser und mehrfachem Wasserwechsel.

2.21.5 Silberfärbung (nach Nesternko et al, 1994)Material:

Proteingele aus 2.21.2

37% Formaldehyd

50% Aceton (in destilliertem Wasser)

50% TCA (in destilliertem Wasser)

20% AgNO_3 (in destilliertem Wasser)

10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ (in destilliertem Wasser)

1% Eisessig (in destilliertem Wasser)

Na_2CO_3

destilliertes Wasser

Färbeschalen

Durchführung:

Das Gel wird zunächst in 60 ml 50% Aceton mit 1,5 ml 50% TCA und 25 μl 37% Formaldehyd für 5 Minuten fixiert, dann dreimal für 5 Sekunden mit destilliertem Wasser gewaschen.

Anschließend wird das Gel für 5 Minuten in destilliertem Wasser inkubiert und erneut dreimal 5 Sekunden mit destilliertem Wasser gewaschen.

Danach folgt eine Vorbehandlung des Gels zunächst für 5 Minuten in 50% Aceton, anschließend in 60 ml destilliertem Wasser mit 100 μl 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$. Erneut wird das Gel dreimal für 5 Sekunden mit destilliertem Wasser gewaschen.

Zum Imprägnieren wird das Gel für 8 Minuten in 60 ml destilliertem Wasser mit 0,8 ml 20% AgNO_3 und 0,6 ml 37% Formaldehyd inkubiert. Danach wird das Gel zweimal für 5 Sekunden mit destilliertem Wasser gewaschen und in 60 ml destilliertem Wasser mit 1,2 g Na_2CO_3 , 25 μl 37% Formaldehyd und 25 μl 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ entwickelt.

Die Reaktion wird mit 1% Eisessig gestoppt.

2.22 Vorinkubation von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit Fraktionen von Wachstumsüberständen oder Periplasma der ausgewählten Antagonisten

Neben Dual Culture Tests, bei der die inhibitorische Wirkung der gewählten Antagonisten auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bei direktem Zellkontakt untersucht wird, werden zusätzlich Vorinkubationsversuche mit Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 durchgeführt. Hierbei soll überprüft werden, ob die Antagonistenstämme hoch- oder niedermolekulare Komponenten sekretieren, die eine hemmende Wirkung auf den biolumineszenten Feuerbranderreger ausüben. Neben den Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 wird auch das Periplasma beider Stämme auf eine inhibitorische Wirkung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE überprüft.

Material:

Wachstumsüberstände aus einer 3-tägigen Kultur von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 in M9-Medium; hochmolekulare, ankonzentrierte Fraktion (> 5 kDa) sowie niedermolekulare Fraktion (< 5 kDa) (siehe 2.18)

Periplasma von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3; hochmolekulare, ankonzentrierte Fraktion (> 5 kDa) sowie niedermolekulare Fraktion (< 5 kDa) (siehe 2.19)

E. amylovora 222::TnluxCDABE

LB-Medium (siehe 2.1)

LB-Agarplatten (siehe 2.2, mit 50 µg Kanamycin/ml)

200 mM Hepes (pH 7,0, steril)

5% Glukose (in destilliertem Wasser, steril)

steriles destilliertes Wasser

Zentrifuge Jouan CR3i von Jouan Industries S.A.S.

Kulturschüttler (28°C)

Durchführung:

E. amylovora 222::TnluxCDABE wird von einer Agarplatte gepickt, in 5 ml LB-Röhrchen überführt und über Nacht bei 28°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Kultur vollständig abzentrifugiert (2 Minuten, 8000 x g) und das Bakterienpellet in 5 ml sterilem destilliertem Wasser aufgenommen.

Zur Vorinkubation mit Fraktionen von Wachstumsüberständen werden je 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE entweder mit 1 µg Protein/µl aus der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände (<5 kDa), oder mit 5 µl der niedermolekularen Fraktion (< 5 kDa) versetzt.

Zur Vorinkubation mit Periplasma werden je 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit 3 µg Protein/µl aus der hochmolekularen Fraktion (> 5 kDa) des Periplasmas, oder mit 5 µl des niedermolekularen Fraktion (< 5 kDa) versetzt.

Als Kontrollen werden Ansätze mit 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Abwesenheit von Fraktionen der Wachstumsüberstände oder des Periplasmas angesetzt.

Das Endvolumen aller Ansätze beträgt 10 µl bei einer Endkonzentration von 20 mM Hepes pH 7,0 und 0,5% Glukose. Nach 24-stündiger Vorinkubation im Kulturschüttler bei 28°C werden die Ansätze punktförmig auf LB-Agar aufgetragen.

Die Platten werden bei 28°C inkubiert und die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE über einen Zeitraum von drei Tagen beobachtet (siehe 2.7).

2.23 Hemmhoftests

In Vanneste et al. (1992) wird beschrieben, dass der Stamm *Pantoea agglomerans* Eh252 antibiotische Substanzen produziert, die nur dann inhibitorisch wirksam gegenüber *E. amylovora* sind, sofern der Inhibierungsversuch auf Minimalmedium stattfindet. Auf Vollmedium kann keine Hemmung beobachtet werden.

Aus diesem Grund werden mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 Hemmhoftests, teilweise mit einer Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, auf einem Minimalmedium durchgeführt, um zu untersuchen, ob mögliche inhibitorische Wirkungen hier verstärkt ausfallen.

Ähnlich wie bei Dual Culture Tests bzw. Vorinkubationsversuchen werden entweder intakte Zellen von Pathogen und Antagonist bzw. Wachstumsüberstände der Antagonisten eingesetzt. Sofern *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 inhibitorisch wirksame Moleküle abgeben, könnte dies in einer Hemmhoftbildung um die Kolonie der Antagonisten oder der Region resultieren, wo die Wachstumsüberstandfraktionen aufgespottet worden sind.

2.23.1 Hemmhoftests mit Zellkulturen

Material:

E. amylovora 222::TnluxCDABE

P. fluorescens A506 bzw. Bk3, Wildtyp und Mutanten

LB-Medium (siehe 2.1)

Minimalagarplatten für *E. amylovora* (siehe 2.2)

steriles destilliertes Wasser

Kulturschüttler (28°C)

Durchführung:

Die *P. fluorescens*-Stämme und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE werden von einer Agarplatte gepickt, in 5 ml LB-Röhrchen überführt und über Nacht bei 28°C inkubiert.

Die Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wird 1:3 mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt und jeweils 100 µl (entspricht ca. 9×10^7 Zellen) auf Minimalagarplatten ausplattiert.

Jeweils 15 µl der Übernachtskulturen der *P. fluorescens*-Stämme (entspricht ca. $6,5 \times 10^7$ Zellen) werden mittig punktförmig auf die Agarplatten pipettiert und die Platten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Versuchsansätze werden auf eine Ausbildung eines Hemmhofes hin beobachtet und für einige Ansätze die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE an drei aufeinander folgenden Tagen gemessen (siehe 2.7).

2.23.2 Hemmhoftests mit WachstumsüberständenMaterial:

E. amylovora 222::TnluxCDABE

Wachstumsüberstände aus einer 3-tägigen Kultur von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in M9-Medium; hochmolekulare, ankonzentrierte Fraktion (> 5 kDa) sowie niedermolekulare Fraktion (< 5 kDa) (siehe 2.18)

LB-Medium (siehe 2.1)

Minimalagarplatten für *E. amylovora* (siehe 2.2)

steriles destilliertes Wasser

Kulturschüttler (28°C)

Durchführung:

Die Vorbereitung der Minimalagarplatten mit einer Vorkultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE erfolgt wie unter 2.23.1 beschrieben.

Mittig der Agarplatte werden entweder 10 µg Protein der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände in einem Endvolumen von 15 µl, oder 15 µl niedermolekularer Durchfluss gespottet. Abweichungen hiervon werden im Ergebnisteil aufgeführt.

Die Platten werden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Versuchsansätze werden auf eine Ausbildung eines Hemmhofes hin beobachtet und für einige Ansätze die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE an drei aufeinander folgenden Tagen gemessen (siehe 2.7).

2.24 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist ein Chromatographie-Verfahren, das vielfältig eingesetzt werden kann. Gelfiltrationsmaterialien wirken wie ein Molekularsieb und können Moleküle verschiedener

Größe voneinander abtrennen. Daher wird dieses Verfahren auch als Ausschluss-Chromatographie bezeichnet.

Das Trennprinzip beruht darauf, dass große Moleküle im Ausschlussvolumen des Säulenmaterials eluieren, während niedermolekulare Moleküle in die Poren des Gelfiltrationsmaterials eindringen und in Abhängigkeit von ihrer Größe später von der Säule eluiert werden. Als Gelfiltrationsmaterialien werden Partikel aus hydrophilen natürlichen oder synthetischen Polymeren eingesetzt, die inert, ungeladen, von uniformer Größe und möglichst druckstabil sind. Die Porengröße des Gelfiltrationsmaterials bestimmt den Bereich der optimalen Auftrennung.

Die Gelfiltration wird durchgeführt, um die niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände (< 5 kDa) von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 weiter aufzutrennen und um anschließend mit einzelnen gewonnenen Fraktionen einen Hemmhoftest auf Minimalagar für *E. amylovora* durchführen zu können, bzw. mit ihnen eine Analyse mittels Dünnschichtchromatographie bzw. Massenspektrometrie zu ermöglichen.

Material:

Niedermolekulare Fraktion (< 5 kDa) von Wachstumsüberständen aus einer 3-tägigen Kultur von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in M9-Medium (siehe 2.18)

Sephadex G-25, fein von Pharmacia

Chromatographiesäule, Länge: 60 cm, Durchmesser: 1,5 cm

Laufmittel: destilliertes Wasser, Fließgeschwindigkeit ca. 1,7 ml/Min

UV-Detektor (280 nm) LKB Bromma 2238 UVicord SII, ABS-Range 0,2 von LKB Instrument GmbH

Pumpe: Peristaltic pump P-1 von Pharmacia

Schreiber von LKB Instrument GmbH

SpeedVac Concentrator plus von Eppendorf

Gefriertrocknung BETA 1-16 von Christ

Wasserstrahlpumpe und Saugflasche

Durchführung:

30 ml der niedermolekularen Fraktion (< 5 kDa) von Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 werden in der SpeedVac bei 45°C oder der Gefriertrocknung auf jeweils 1,5 ml eingengt.

Das Säulenmaterial G-25 wird über Nacht in destilliertem Wasser vorgequollen, am nächsten Tag in der Saugflasche unter Anlegen eines Vakuums mit der Wasserstrahlpumpe entgast und die Säule ca. 50 cm hoch mit dem Säulenmaterial befüllt.

Die Chromatographie findet im Kühlraum bei 4°C statt.

Die Säule wird mit dem doppelten Säulenvolumen an destilliertem Wasser gespült; die Laufgeschwindigkeit beträgt ca. 1,7 ml/Minute.

Anschließend wird die gesamte Probe auf die Säule aufgetragen und der Chromatographieverlauf beobachtet.

Einzelne Komponenten, die von der Säule eluiert, vom UV-Detektor bei 280 nm detektiert und vom Schreiber als Peaks dargestellt werden, werden separiert, teilweise fraktioniert aufgefangen und erneut in der Speedvac bei 45°C auf ca. 150 µl Endvolumen eingengt. Mit den einzelnen separierten Fraktionen werden Hemmhoftests (siehe 2.23) durchgeführt, um zu überprüfen, welche Fraktion eine inhibitorische Wirkung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE aufweist. Ferner werden die Fraktionen mittels Dünnschichtchromatographie (2.25) bzw. mittels Massenspektrometrie (2.26) untersucht.

2.25 Dünnschichtchromatographie von der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 nach Gelfiltration

Vereinzelte Fraktionen der unter 2.24 beschriebenen Gelfiltration sollen mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt werden, um die Zusammensetzung der in der Gelfiltration beobachteten Peaks analysieren zu können.

Bei der Dünnschichtchromatographie handelt es sich um eine Verteilungschromatographie, bei der es zu einer unterschiedlichen Verteilung von Stoffen in zwei Phasen kommt. Die mobile Phase (flüssig/in diesem Fall Ethanol) bewegt sich an einer stationären Phase (fest/in diesem Fall mit Kieselgel beschichtete Platten) vorbei, wobei aufzutrennende Substanzen je nach Polarität von Testsubstanz und Laufmittel unterschiedlich schnell von dem flüssigen Laufmittel mit transportiert werden.

Material:

Eingeengte Fraktionen der Gelfiltration aus 2.24

Salizylsäure-Standard (1% in 96% Ethanol)

70% Ethanol

0,1 % Ninhydrinlösung (in 96% Ethanol)

Eisenreagenz (1,7% FeCl₃ in destilliertem Wasser und 96% Ethanol [Verhältnis 1:2])

DC Platten: Polygram® SIL G UV₂₅₄ von Macherey Nagel

DC-Kammer

UV-Tisch (312 nm) von Bachofer

Wärmeplatte zum Nachweis primärer und sekundärer Amine

Durchführung:

Jeweils 7 µl einzelner eingeengter Fraktionen oder 7 µl Salizylsäure-Standard werden am unteren Rand der DC-Platten aufgespottet und die Platten nach Abtrocknen der Spots in DC-Kammern mit 70% Ethanol als Laufmittel überführt.

Nach Beendigung der Chromatographie werden die DC-Platten getrocknet und auf dem UV-Tisch bei 312 nm ausgewertet.

Mittels Besprühen mit Ninhydrin und einer anschließende Erwärmung der DC-Platten auf der Wärmeplatte kann ein Nachweis auf primäre und sekundäre Amine ermöglicht werden.

Mittels Besprühen mit Eisenreagenz kann Salizylsäure nachgewiesen werden.

2.26 Analyse der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mittels Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zum Messen des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) von Teilchen. Dazu wird die zu untersuchende Substanz in die Gasphase überführt, ionisiert und die ionisierten Teilchen durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Dieser Teilchenstrahl wird im Analysator nach dem m/z -Verhältnis aufgetrennt.

Bei dem hier verwendeten Gerät handelt es sich um ein Quadrupol-Ionenfallen Massenspektrometer mit externer Ionenquelle.

Elektronen werden auf ca. 100 eV beschleunigt, stoßen mit den Atomen/Molekülen der Probe zusammen und ionisieren diese dabei. Die erzeugten Ionen werden durch ein statisches, elektrisches Feld beschleunigt und durchfliegen zentral vier parallel liegende Stabelektroden, deren Schnittpunkte mit einer Ebene senkrecht zur Zylinderachse ein Quadrat bilden (Quadrupol). Im Wechselfeld zwischen den Quadrupol-Stäben findet eine m/z -Selektierung statt, so dass jeweils nur Teilchen mit einer definierten Masse das Feld durchlaufen können. Die Ionen treffen in einem Detektor mit Messverstärker auf, der den Ionenstrom misst und von der Software des angeschlossenen PCs zur Zählrate umgerechnet wird.

Material:

Fraktionen aus der Gelfiltration (Peak 1 und 2) von den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (siehe 2.24)

Methanol (mit 2% Essigsäure)

Massenspektrometer: LCQ (Quadrupol-Ionenfallen Massenspektrometer mit externer Ionenquelle) von Finnigan MAT

Durchführung:

Die oben genannten Proben werden 1:1 mit Methanol (mit 2% Essigsäure) versetzt, so dass eine Endkonzentration von 50% Methanol und 1% Essigsäure vorliegt.

Der Probenauftrag auf die MS beträgt 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, mit einer Ionisierungsenergie von 4,5 kV und einer Kapillartemperatur von 200°C (Elektronenspray Ionisierung). Die Messung erfolgt im positiven Modus, d. h. die Proben werden protoniert. Als Referenzen dienen Koffein (195 m/z), MFRA (Peptid aus Methionin, Phenylalanin, Arginin und Alanin; 525 m/z) und Ultramark (Phosphazene-Standard; 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822 m/z)

2.27 Pikrinsäuretest zur Detektion von Cyanwasserstoff (HCN)

Der Zusammenhang von der Produktion von HCN durch *P. fluorescens* Stämme mit einer antagonistischen Wirkung gegenüber anderen Organismen ist bereits beschrieben worden (Corbell und Loper, 1995; Lorck, 1948; Paul und Sarma, 2006; Reddy et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die ausgewählten *P. fluorescens*-Stämme A506 bzw. Bk3 auch HCN produzieren können, was in einem Zusammenhang mit der inhibitorischen Wirkung gegenüber *E. amylovora* stehen könnte.

Zum Nachweis wird hier eine leicht abgewandelte Methode nach Lorck (1948) verwendet, bei der in Pikrinsäure getauchtes Filterpapier in einer Petrischale mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm befestigt und versiegelt wird. Sofern HCN produziert wird, reagiert dieser mit Pikrinsäure und färbt sie von gelb nach orange-braun.

Material:

P. fluorescens A506, *P. fluorescens* Bk3, *P. fluorescens* Pf-5, *P. fluorescens* 2-79

E. amylovora 222::TnluxCDABE

Kings B Agarplatten (siehe 2.2)

Whatmanfilter (2 mm) von Roth

1,2% Pikrinsäure mit 2,5% NaCO₃

Parafilm, Tesafilm

Durchführung:

Der Whatmanfilter wird auf 2 x 5 cm große Streifen zurechtgeschnitten und in die Pikrinsäurelösung getaucht.

Nach Trocknen der Streifen werden diese mit Tesafilm am Deckel von Agarplatten befestigt, auf die zuvor die oben aufgeführten Teststämme mit einer Impföse ausgestrichen worden sind. Die Platten werden mit Parafilm verschlossen und zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie auf einen Farbumschlag der Pikrinsäure hin untersucht werden. Jeder Ansatz wird dreimal wiederholt.

2.28 Nachweis von 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG), Phenazin-1-Carbonsäure (PCA) und Pyoluteorin (PLT) in der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Die Produktion von DAPG, PCA und PLT und die damit verbundene Kontrolle von Phytopathogenen konnte schon für verschiedene *Pseudomonas*-Stämme nachgewiesen werden (De Souza und Raaijmakers, 2003; Raaijmakers et al., 1997).

In Kollaboration mit Prof. Dr. Raaijmakers (Wageningen University, Wageningen, Niederlande) soll untersucht werden, ob *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zu den Stämmen gehören, die diese Antibiotika produzierenden.

Material:

P. fluorescens A506 bzw. Bk3

5 ml-Röhrchen mit M9-Medium (mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose), siehe 2.1

TFA (Trifluoressigsäure)

Ethylacetat

ACN (Acetonitril)

Methanol

Standards:

DAPG: von Toronto Research Chemicals Inc., Canada

PCA: ursprünglich aus *P. fluorescens* 2-79RN10 isoliert und aufgereinigt

PLT: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. G. Bloemberg (Leiden University, Niederlande)

RP-HPLC-Säule C18 (reverse phase symmetry column) von Waters

Zentrifuge Jouan CR3i von Jouan Industries S.A.S.

Gefriertrockner BETA 1-16 von Christ

Durchführung:

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 werden über Nacht bei 28°C in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose angezogen. Die Zellen werden über einen Zentrifugationsschritt bei 8000 x g abzentrifugiert.

4 ml des Wachstumsüberstandes werden mit einer Endkonzentration von 0,1 % mit TFA angesäuert, dann mit 4 ml Ethylacetat versetzt und für 30 Sekunden geschüttelt.

Die Proben werden für einige Stunden in einen -20°C Gefrierschrank überführt. Die untere wässrige Fraktion friert ein, während die obere Ethylacetatfraktion flüssig bleibt, abgenommen und in der Gefriertrocknung komplett getrocknet werden kann.

Die gefriergetrockneten Produkte werden in jeweils 200 µl Methanol gelöst. Von dieser Lösung werden 50 µl auf die HPLC-Säule aufgetragen.

Die Analyse wird nach Bonsall et al. (1997) mittels einer C18 RP-HPLC-Säule durchgeführt, an die ein Lösungsmittelgradient (0-100 % ACN + 0,1% TFA in 40 Minuten, 8 Minuten bei 100% ACN + 0,1% TFA, 0,5 ml/Minute) angelegt wird. Die Detektion der Antibiotika erfolgt bei einer Wellenlänge von 254 nm.

2.29 Biologische Kontrolle von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Neben der Hemmung von *E. amylovora* durch hoch- und niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Minimalmedium wird die

Kontrolle des Feuerbranderreger durch die niedermolekulare Fraktion der Antagonisten auf Blüten des suszeptiblen *M. domestica* cvs. Holsteiner Cox durchgeführt. Die Infektionskontrolle erfolgt durch Überprüfung auf Krankheitssymptomen sowie die Stoffwechselaktivität von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch Messung von Biolumineszenz.

Material:

Übernachtkultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE

Zweige mit Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Niedermolekulare Fraktion (< 5 kDa) von Wachstumsüberständen aus einer 3-tägigen Kultur von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in M9-Medium (siehe 2.18)

Sprühflasche

Dunkelkammer mit integrierter Cleanbench und CCD-Kamera (siehe 2.7)

Durchführung:

Folgende Versuchsansätze werden durchgeführt:

1. Kontrolle: Ausschließlich Infektion mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE.
2. Vorbehandlung mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506, dann Infektion mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE.
3. Vorbehandlung mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* Bk3, dann Infektion mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE.

Die Vorbehandlung erfolgt durch Einsprühen der Blütenoberseite mit der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände; pro Blüte wird 1 Sprühstoß (ca. 100 µl) eingesetzt. Die Infektion erfolgt durch Auftragen von 10 µl Übernachtkultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (in LB-Medium, ca. 3×10^7 Zellen) auf den Stempel der Blüten.

Für jeden Versuchsansatz werden zwei Zweige mit drei bis vier Blüten verwendet.

Der Infektionsverlauf wird über einen Verlauf von vier Tagen (Tag 0-3) beobachtet und mit Fotos belegt; zusätzlich wird jeden Tag die Biolumineszenz der Bakterien in den Blüten gemessen. Die Zweige mit den Blüten werden in einer Klimakammer mit einem 12/12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus bei 15°C/23°C gehalten, zur Aufrechterhaltung einer die Infektion begünstigenden hohen Luftfeuchtigkeit wird ein Luftbefeuchter mit destilliertem Wasser aufgestellt.

Für die Biolumineszenzmessung (Aufbau der dabei verwendeten CCD-Kamera wurde unter 2.7 bereits beschrieben) werden zunächst Lichtbilder der Blüten (Belichtung 1 ms, Gain 3, Binning 4 x 4), anschließend Biolumineszenzbilder (Belichtungszeit 10 Sekunden, Gain 3, Binning 4 x 4) aufgenommen.

Die Bilder werden mit IP-Lab 3.06 (Scanalytic) bearbeitet und Falschfarben-Überlagerungsbilder erstellt. Auf eine Quantifizierung der Biolumineszenz wird verzichtet; die Auswertung erfolgt rein qualitativ.

3. Ergebnisse

3.1 Transformation von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie *E. amylovora* 222 mit Luziferasereportergenen

Per Transformation wurden biolumineszente *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 durch Tn5-Transposon-vermittelte Übertragung der *luxAB*-Gene ins Genom der Bakterien, sowie autobiolumineszenter *E. amylovora* 222 durch Tn5-vermittelte Übertragung des Luziferase-Operons *luxCDABE* hergestellt.

Das Plasmid pUTgf_{luxAB} kann auf Grund des fehlenden λ -pir Gens nicht in *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 repliziert werden. Eine Plasmid-vermittelte Biolumineszenz und Kanamycin-Resistenz kann nur dann beobachtet werden, wenn eine Transposon-vermittelte Integration der *gf_{luxABnptII}*-Kassette ins Genom stattfindet. *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3-Transformanden zeigten nach Zugabe von 10 μ l 2%igem Decanal pro Agarplatte eine deutliche Biolumineszenz bei einer 30-sekündigen Belichtungszeit der CCD-Kamera (Abb. 3.1.1 A und B). Die Bakterien wiesen zusätzlich eine Kanamycin-Resistenz auf. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Gene *luxABnptII* stabil ins Genom der Wirtsorganismen integriert worden sind. Die Transformanden haben die Bezeichnung *P. fluorescens* A506::*Tngf_{luxAB}* bzw. Bk3::*Tngf_{luxAB}* erhalten. Einzelne Transformanden wurden gepickt und auf LB-Agarplatten (mit Kanamycin 50 μ g/ml) vereinzelt.

Ähnlich verhält es sich mit Plasmid pRL1406. Auch hier wird nur dann eine Plasmid-vermittelte Biolumineszenz und Kanamycin-Resistenz beobachtet, wenn eine Transposon-vermittelte Integration der *luxCDABEnptII*-Kassette ins Genom stattfindet. *E. amylovora* 222-Transformanden zeigten unabhängig von einer Decanalzugabe eine Autobiolumineszenz und Kanamycin-Resistenz. Die Transformation hat Transformanden mit relativ inhomogener Intensität der Biolumineszenz (Abb. 3.1.1 C) ergeben, was daraus zu erklären ist, dass das *luxCDABE*-Operon promotorlos ins Genom der Wirtszelle übertragen wird und hinter einen Promotor seiner Wirtszelle integriert werden muss, um die Autobiolumineszenz der Wirtszelle zu bewirken. Abhängig davon, ob dem Promotor nachfolgende Gene stärker oder schwächer exprimiert werden, ist auch die Autolumineszenz stärker oder schwächer ausgeprägt.

Der *E. amylovora* 222-Transformand mit der stärksten gemessenen Biolumineszenz bei 30 Sekunden Belichtungszeit ist auf LB-Agarplatten (mit Kanamycin 50 μ g/ml) vereinzelt worden, wurde als *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* bezeichnet und für weitere Versuche eingesetzt.

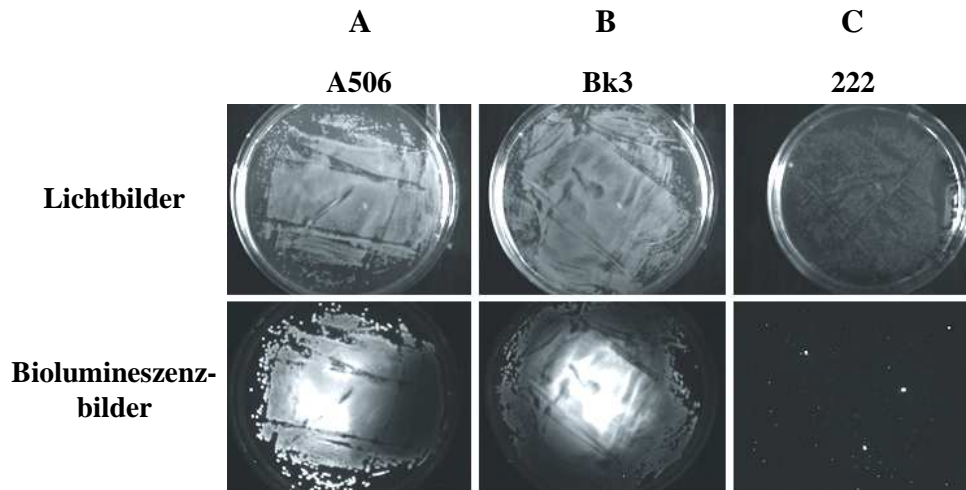


Abb. 3.1.1 Messung der Biolumineszenz von Transformanten auf LB-Agar. **A** *P. fluorescens* A506::TngfpluxAB **B** *P. fluorescens* Bk3::TngfpluxAB (A506, Bk3). **C** *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (222). **Oben** Lichtbilder (5 msec., Gain 3, Binning 4 x 4), **unten** Biolumineszenzbilder. Messung der Biolumineszenz nach Zugabe von 10 µl Decanal bei *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3::TngfpluxAB. (Belichtungszeit 30 sec., Gain 3, Binning 4 x 4). Messung der Biolumineszenz Decanal-unabhängig bei *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (Belichtungszeit 30 sec., Gain 3, Binning 4 x 4).

3.2 Dual Culture Tests von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 sowie *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Die Beurteilung der antagonistischen Wirkung von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE erfolgte durch Co-Kultivierung von Antagonist und Pathogen auf verschiedenen Kulturagar sowie Messung von Biolumineszenz.

3.2.1 Dual Culture Test von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 auf PDA

Bei Co-Kultur von je 1×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 auf PD-Agar (pH 5,6, gepuffert) konnte sowohl bei Dual Culture Tests mit *A. pullulans* CF10 als auch mit *A. pullulans* CF40 innerhalb von 24 Stunden zunächst eine etwa 2000-fache Zunahme der Biolumineszenz des Pathogens beobachtet werden. Im Verlauf der weiteren 24 Stunden wurde zwar eine Reduktion beobachtet, die aber immer noch in Bezug auf die gemessenen Biolumineszenz der Kontrolle (*E. amylovora* 222::TnluxCDABE ohne Anwesenheit eines Antagonisten) 40% für die Co-Kultur mit *A. pullulans* CF10 und 14% für die Co-Kultur mit *A. pullulans* CF40 betrug (Abb. 3.2.1.1 A und B, Tabelle 3.2.6.1).

Allerdings überschritt die nach 24 und 48 Stunden gemessene Biolumineszenz (auch in den Ergebnisteilen 3.2.1-3.2.4 sowie 3.7) unter den gewählten Bedingungen (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4 x 4) die full well Kapazität des CCD-Chips und eine Sättigung

trat auf. Die gewählten Konditionen waren allerdings erforderlich, um die Biolumineszenz nach null Stunden messen zu können. Aus diesem Grund ist die tatsächliche Differenz der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in An- und Abwesenheit der verwendeten Antagonistenstämme vermutlich weitaus größer und die in diesen Ergebnisteilen gezeigten Kurven haben eher einen linearen als einen asymptotischen Charakter.

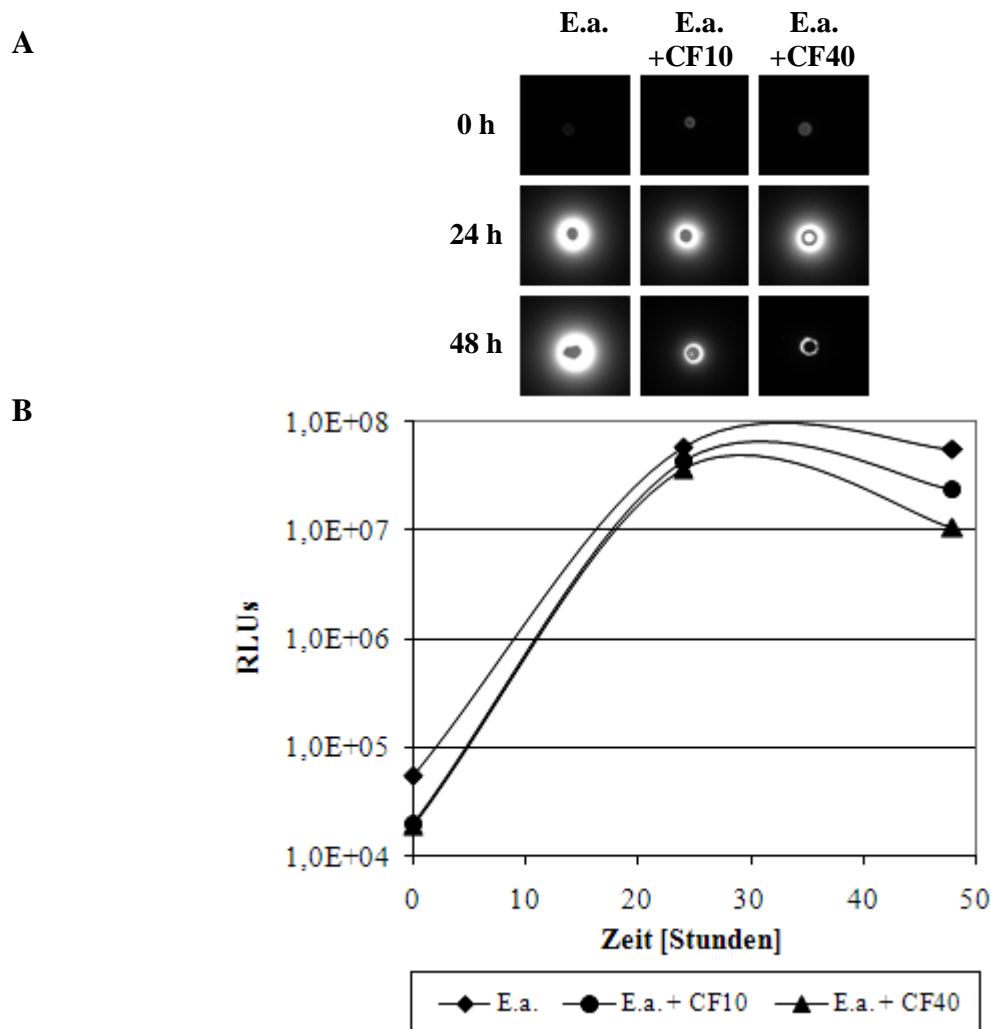


Abb. 3.2.1.1 A Messung der Biolumineszenz bei Co-Kultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) und *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 (CF10/CF40) auf PD-Agar. Jeweils 1×10^7 Zellen von Pathogen und Antagonist wurden punktförmig in einem Endvolumen von 10 μ l (in LB-Medium) auf den Agar gespottet. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24 und 48 Stunden. (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4 x 4). **B** Quantifizierung der gemessenen Biolumineszenz bei Co-Kultur gleicher Zellzahlen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und *A. pullulans* CF10 bzw. CF40. Die Quantifizierung und Auswertung der gemessenen Biolumineszenz erfolgte mit IPLab und Excel 2000.

3.2.2 Dual Culture Test von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 auf NBS

Versuche wurden auch mit je 1×10^7 Zellen von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 mit dem autbiolumineszenten Stamm *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf NBS-Agar (pH 5,8, ungepuffert) durchgeführt, wobei Pathogen und Antagonist wieder in einem Endvolumen von 10 μ l (in LB-Medium) auf die entsprechenden Agarplatten gespottet worden sind.

Bei der gemeinsamen Kultivierung von je 1×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 konnte auf NBS-Platten, bei denen zwar der pH eingestellt werden konnte, die aber keine Pufferkapazität hatten, sowohl bei Dual Culture Tests mit *A. pullulans* CF10 als auch mit *A. pullulans* CF40 innerhalb von 24 Stunden zunächst eine etwa 180-fache bzw. 80-fache Zunahme der Biolumineszenz des Pathogens beobachtet werden. Erst in den darauffolgenden 72 Stunden war die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222 in Dual Culture Tests mit *A. pullulans* CF40 auf ein nicht mehr detektierbares Level abgesunken, in Dual Culture Tests mit *A. pullulans* CF10 konnte aber nach 96 Stunden immer noch eine Restbiolumineszenz von 2 % (in Bezug auf die Kontrolle) beobachtet werden (siehe Abbildung 3.2.2.1 A und B, Tabelle 3.2.6.1).

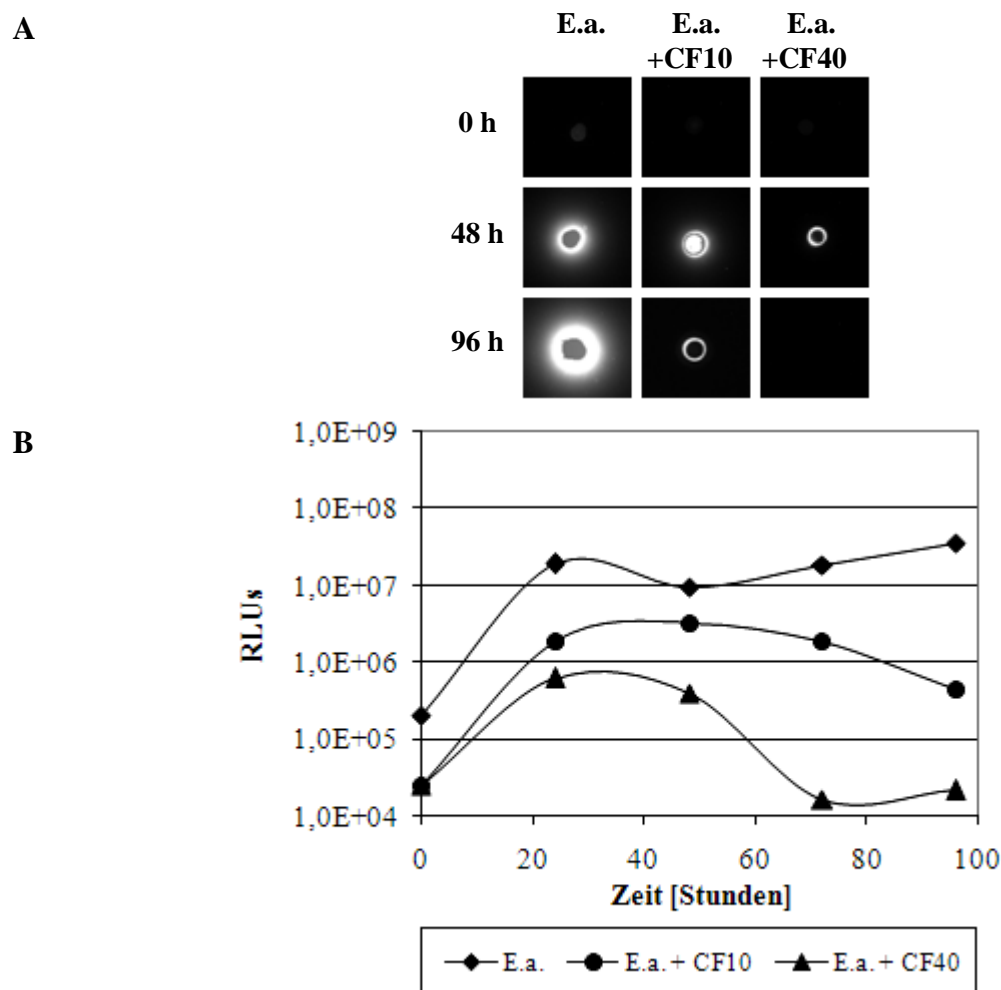


Abb. 3.2.2.1 A Messung der Biolumineszenz bei Co-Kultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E. a. 222) und *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 (CF10/CF40) auf NBS-Agar (ungepuffert, pH 5,8). Jeweils 1×10^7 Zellen von Pathogen und Antagonist wurden punktförmig in einem Endvolumen von 10 μ l (in LB-Medium) auf den Agar gespottet. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24, 48, 72, 96 Stunden (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4 x 4). **B** Quantifizierung der gemessenen Biolumineszenz bei Co-Kultur gleicher Zellzahlen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und *A. pullulans* CF10 bzw. CF40. Die Quantifizierung und Auswertung der gemessenen Biolumineszenz erfolgte mit IPLab und Excel 2000.

3.2.3 Dual Culture Tests von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 auf NBSP

Bei einer Wiederholung dieser Dual Culture Tests auf den gepufferten NBSP-Agarplatten (pH 7,0, gepuffert) konnte zwar auch eine Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* beobachtet werden, diese verlief aber im Vergleich zum ungepufferten System deutlich langsamer ab. Auch hier wurde zunächst innerhalb der ersten 24 Stunden eine deutliche (17-30-fache) Zunahme der Biolumineszenz des Pathogens unter Dual Culture Test Bedingungen beobachtet. Nach 96 Stunden Kultivierung war allerdings immer noch eine Restbiolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE von 19-23% sowohl in Dual Culture Tests mit *A. pullulans* CF10 als auch mit *A. pullulans* CF40 detektierbar (siehe Abbildung 3.2.3.1 A und B, Tabelle 3.2.6.1).

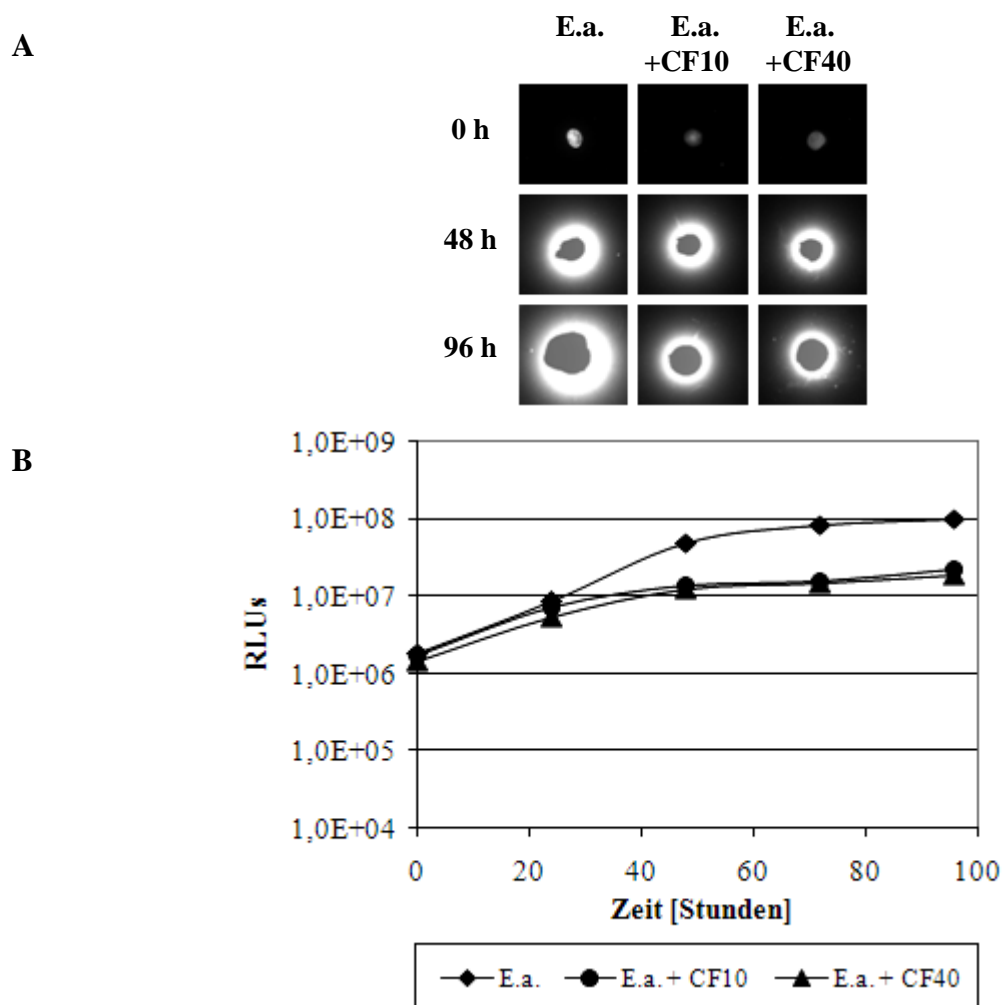


Abb. 3.2.3.1 A Messung der Biolumineszenz bei Co-Kultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E. a. 222) und *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 (CF10/CF40) auf NBSP-Agar (gepuffert, pH 7,0). Jeweils 1×10^7 Zellen von Pathogen und Antagonist wurden punktförmig in einem Endvolumen von 10 μ l (in LB-Medium) auf den Agar gespottet. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24, 48, 72, 96 Stunden (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4 x 4). **B** Quantifizierung der gemessenen Biolumineszenz bei Co-Kultur gleicher Zellzahlen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und *A. pullulans* CF10 bzw. CF40. Die Quantifizierung und Auswertung der gemessenen Biolumineszenz erfolgte mit IPLab und Excel 2000.

3.2.4 Vorbehandlung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit hoch- und niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *A. pullulans* CF10 und CF40

Eine 24-stündige Vorinkubation von autbiolumineszenten *E. amylovora* 222 mit der hoch- bzw. niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 bewirkte keine messbare Reduktion der Biolumineszenz des Pathogens (keine Abbildung gezeigt). Es ist davon auszugehen, dass die Hefestämme keine auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE inhibitorisch wirksamen Substanzen in ihren Kulturüberstand sekretieren.

3.2.5 Dual Culture Tests von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Je 1×10^7 Zellen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 wurden mit dem autbiolumineszenten Stamm *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in einem Endvolumen von 10 µl auf LB-Agarplatten gespottet und die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet. Als Kontrolle wurden 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Abwesenheit eines Antagonisten auf LB-Agar gespottet.

Bei Co-Kultur von Pathogen und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte nach 24 Stunden auf LB-Agar durchschnittlich eine etwa 2,5-3-fache Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (bis auf 30-40% der Ausgangsbiolumineszenz nach 0 Stunden) beobachtet werden. Die Kontrolle zeigte hingegen nach 24 Stunden ein 50-fach stärkere Biolumineszenz als die Ansätze mit den Antagonisten. Nach 48 Stunden konnte eine nahezu vollständige Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der Antagonisten beobachtet werden (Reduktion auf ca. 1% der gemessenen Biolumineszenz nach 48 Stunden in Bezug auf die Kontrolle; Abb. 3.2.5.1, A und B, Tabelle 3.2.6.1).

Ohne Anwesenheit der Antagonisten nahm die Biolumineszenz des Pathogens hingegen innerhalb von zwei Tagen gleichzeitig mit dem Wachstum der Bakterien auf der Agarplatte stark zu.

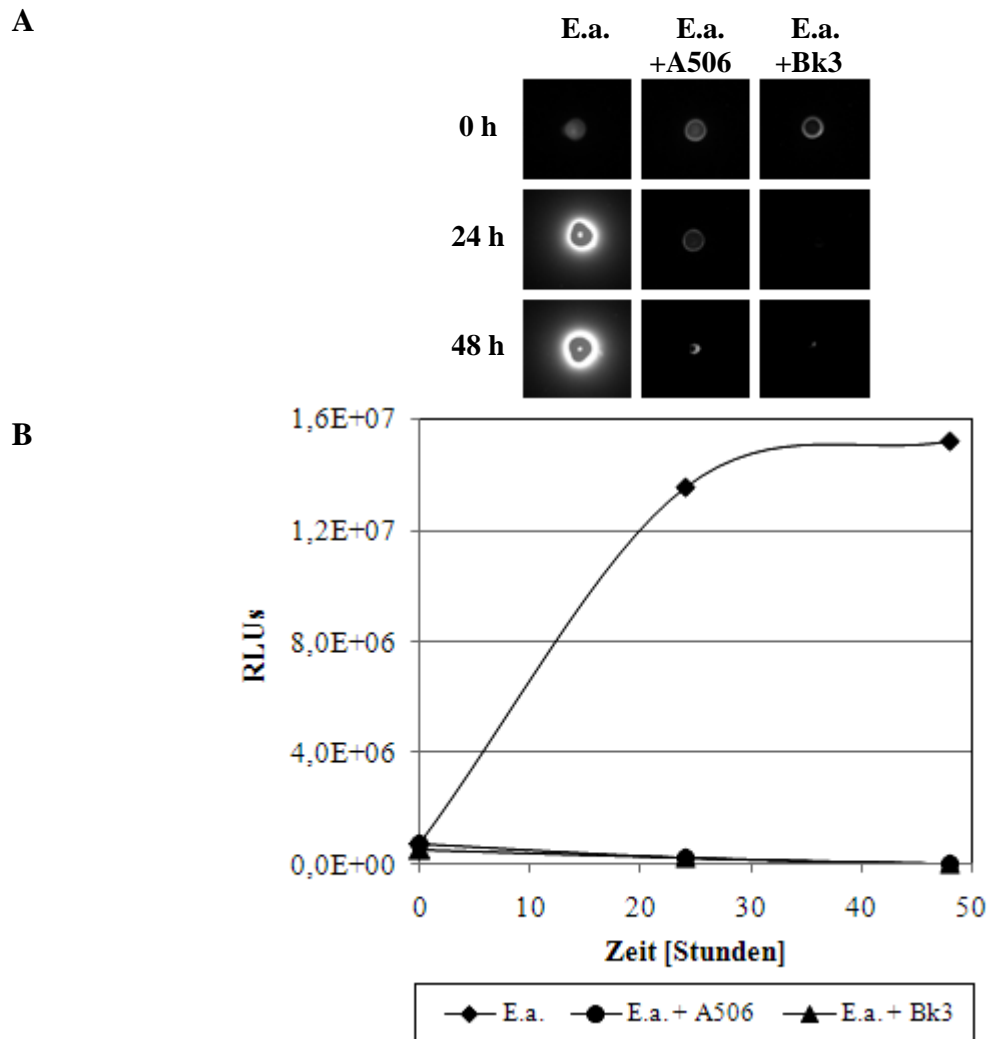


Abb. 3.2.5.1 A Messung der Biolumineszenz bei Co-Kultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506/Bk3). Jeweils 1×10^7 Zellen von Pathogen und Antagonist wurden punktförmig in einem Endvolumen von 10 μ l (in LB-Medium) auf LB-Agar gespottet. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24 und 48 Stunden. (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4 x 4). **B** Quantifizierung der gemessenen Biolumineszenz bei Co-Kultur gleicher Zellzahlen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Die Quantifizierung und Auswertung der gemessenen Biolumineszenz erfolgte mit IPLab und Excel 2000.

3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse von 3.2.1 bis 3.2.5

Insgesamt verlief die Reduktion von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 auf den verschiedenen verwendeten Medien PDA, NBS und NBSP im Vergleich zu den Bakterienstämmen *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 verzögert. Bei allen Ansätzen mit den Hefen wurde zunächst eine Zunahme der Biolumineszenz innerhalb von 24 Stunden beobachtet, bevor eine Reduktion der Biolumineszenz bedingt durch *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 gezeigt werden konnte. Lediglich auf einem ungepufferten, bereits leicht saurem Medium (NBS-Agar, pH 5,8) konnte eine vollständige Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE innerhalb von 72 Stunden beobachtet werden.

Die gemessene Biolumineszenz bei Einzelkultivierung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf NBSP (pH 7,0) lag teilweise nahezu eine Zehnerpotenz höher als die Biolumineszenz bei

Kultur auf NBS oder PDA. Möglicherweise könnte hier der saurere pH dieser Medien (PDA = 5,6, NBS = 5,8) eine auf den Stoffwechsel des Feuerbrandreggers hemmende Wirkung gehabt haben, was in einer niedrigeren gemessenen Biolumineszenz resultierte.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 reduzierten hingegen bereits innerhalb von 24 Stunden deutlich die Stoffwechselaktivität von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE; nach 48 Stunden war die Biolumineszenz bis zu einem nahezu nicht mehr detektierbaren Level abgesunken, während die Kontrolle ohne Antagonist nach wie vor eine starke Biolumineszenz zeigte. Unter *in vitro* Bedingungen sind *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 demnach, was die Geschwindigkeit der Unterdrückung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE angeht, *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 überlegen.

A. pullulans CF10 bzw. CF40 sind in der Lage, Kulturmedien anzusäuern. Bei einer Kultivierung dieser beiden Stämme in NBS-Medium (pH 5,8) konnte eine Verschiebung des pH innerhalb von drei Tagen auf ca. pH 4 gemessen werden (keine Daten gezeigt). Dieser pH bietet keine möglichen Wachstumsbedingungen für *E. amylovora*. Es ist zu vermuten, dass der antagonistische Wirkmechanismus der untersuchten Hefen hauptsächlich über eine Ansäuerung von Kulturmedien stattfindet, was von Kunz (2005) bereits beschrieben wurde.

Die zuvor aufgeführten Ergebnisse wurden noch einmal in Tabelle 3.2.6.1 zusammengefasst.

Tab. 3.2.6.1 Auswertung der Dual Culture Tests mit je 1×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bzw. *A. pullulans* CF10 und CF40. Die gemessene Biolumineszenz (nach 24, 48, 72 und 96 Stunden) von *E. amylovora*::TnluxCDABE in Gegenwart der Antagonisten wurde prozentual auf die gemessene Biolumineszenz von *E. amylovora*::TnluxCDABE (bei alleinigem Auftrag auf LB-Agar) bezogen.

| | Relative Biolumineszenz [%] von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE in Gegenwart von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 sowie <i>A. pullulans</i> CF10 und CF40 | | | | | |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------|------|--------------------|------|
| | A506 | Bk3 | | | | |
| <i>P. fluorescens</i> | | | | | | |
| 24 Stunden | 2 | 2 | | | | |
| 48 Stunden | 1 | 1 | | | | |
| | PD-Agar (pH 5,6) | | NBS-Agar (pH 5,8) | | NBSP-Agar (pH 7,2) | |
| | CF10 | CF40 | CF10 | CF40 | CF10 | CF40 |
| <i>A. pullulans</i> | | | | | | |
| 24 Stunden | 73 | 63 | 10 | 3 | 84 | 64 |
| 48 Stunden | 62 | 19 | 33 | 4 | 27 | 25 |
| 72 Stunden | 40 | 14 | 10 | 0 | 19 | 18 |
| 96 Stunden | - | - | 2 | 0 | 23 | 19 |

3.3 Mutagenese von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

3.3.1 Erstellung des Vektors pUT

Zur Mutagenese von *P. fluorescens* A506 wurde aus Vektor pUTgffluxAB der Vektor pUT hergestellt, indem über eine *NotI*-Spaltung die *gffluxAB*-Kassette herausgespalten und der Vektor anschließend religiert wurde.

Nach der Spaltung von pUTgffluxAB mit *NotI* ist eine Gelelektrophorese durchgeführt worden. Die Restriktionsenzymspaltung mit *NotI* ergab ein ca. 8 kb großes Fragment, das das Rückrad des Vektors mit dem Transposase-Gen und dem Kanamycin-Resistenzgen *nptII* enthielt, sowie ein etwa 4 kb großes Fragment mit den Genen *luxAB* und *gfp* (Abb. 3.3.1.1, links).

Die 8 kb Bande ist ausgeschnitten und mit dem QIAEXII Gel Extraction Kit aus dem Gel aufgereinigt worden. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde ebenfalls eine Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 3.3.1.1, rechts).

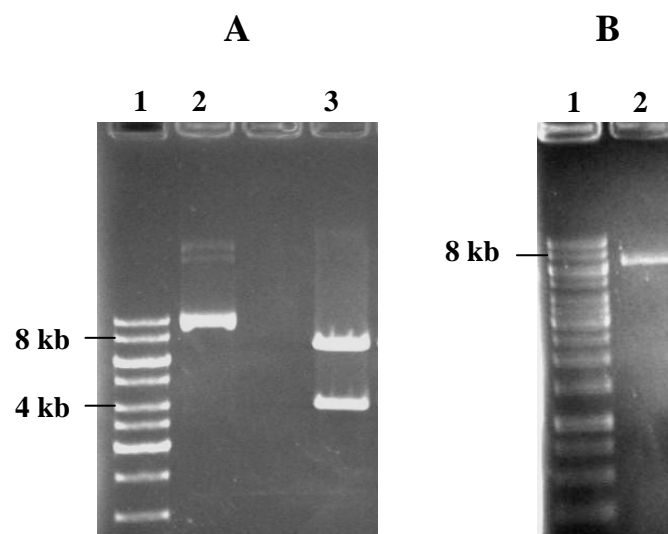


Abb. 3.3.1.1 Konstruktion des Vektors pUT aus pUTgffluxAB **A** *NotI*-Spaltung von pUTgffluxAB. Spur 1: Gene Ruler 1 kb DNA-Marker, Fermentas, Spur 2: pUTgffluxAB, ungespalten, Spur 3: pUTgffluxAB, *NotI*-gespalten. Auftragsvolumen der Spaltung: 25 μ l. Auftragsvolumen von pUTgffluxAB: 5 μ l aus einer Plasmidpräparation **B** Aufgereinigte 8 kb-Bande aus der Spaltung von pUTgffluxAB mit *NotI*. Auftragsvolumen der Aufreinigung: 5 μ l. Spur 1: Gene Ruler 1 kb DNA-Marker, Fermentas, Spur 2: Aufreinigung des pUT-Fragmentes. A und B: jeweils 1%iges Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung.

Nach erfolgreicher Aufreinigung der 8 kb-Bande ist der Restvektor religiert und per Elektroporation in elektrokompente *E. coli* S17-1 α λ -pir übertragen worden. Aus erfolgreich transformierten Kanamycin-resistenten Bakterien ist der jetzt als pUT bezeichnete Vektor reisoliert und eine Gelelektrophorese zur Kontrolle der Plasmidpräparation durchgeführt worden. Eine erfolgreiche Plasmidpräparation ist möglich gewesen (Abb. 3.3.1.2) und das Plasmid pUT wurde zur Mutagenese von *P. fluorescens* A506 eingesetzt.

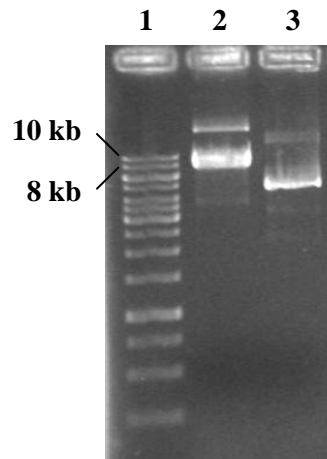


Abb. 3.3.1.2 Plasmidpräparation von pUTgffluxAB und pUT mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit von Fermentas aus erfolgreich transformierten *E. coli* S17-1 α λ -pir. Spur 1: Gene Ruler 1 kb DNA-Marker, Fermentas, Spur 2: pUTgffluxAB, Spur 3: pUT. Auftragsvolumen der Plasmidpräparation: je 5 μ l. 1%iges Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung.

3.3.2 Mutagenese und Screening der Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf eine reduzierte inhibitorische Wirkung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch Messung von Biolumineszenz

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Insertionsmutagenese Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 erstellt, die über Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf eine verminderte Hemmung des autolumineszenten Feuerbranderregers im Vergleich zu den Wildtypen gescreent worden sind.

Die Mutagenese von *P. fluorescens* A506 konnte mittels Transformation mit dem Plasmid pUT erfolgreich durchgeführt werden (Methodik siehe 2.10.1). Mittels dieses Plasmids wird Transposase-vermittelt das *nptII*-Gen per Zufall ins Genom des Wirtsorganismus übertragen und kann dort Gene unterbrechen. Die Transformationsansätze wurden auf insgesamt 30 LB-Agarplatten (mit 50 μ g/ml Kanamycin) ausplattiert. Insgesamt konnten mehrere tausend Insertionsmutanten generiert werden, von denen 4776 vereinzelt und, wie später aufgeführt, näher untersucht worden sind.

Die Mutagenese von *P. fluorescens* Bk3 fand durch Konjugation mit *E. coli* DH5 α λ pir pRL27 statt; dieses Plasmid besitzt einen RP4 origin of transfer (*oriT*), der eine Übertragung des Plasmids via Konjugation mit den *E. coli* Donorzellen erlaubt. Auf Grund des R6K DNA Replikationsursprung, der zusätzlich mit dem *nptII*-Gen Transposase-vermittelt ins Genom der Wirtszellen übertragen wird, kann später eine Klonierung der Insertionsmutanten erfolgen. Auch bei dieser Mutagenese werden demnach durch zufällige Integration von *nptII* ins Genom Gene unterbrochen. Die Konjugationsansätze wurden auf insgesamt 30 MG-Agarplatten (mit Kanamycin, 50 μ g/ml und Ampicillin, 100 μ g/ml) ausplattiert, da dieses Selektionsmedium nur die Vermehrung von *P. fluorescens*, aber nicht von *E. coli*-Stämmen

ermöglicht. Insgesamt wurden 2086 Insertionsmutanten von *P. fluorescens* Bk3 generiert, die alle vereinzelt und, wie später aufgeführt, näher untersucht worden sind.

Das Screening der Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 hat in drei Etappen stattgefunden. In Etappe eins wurden die Mutanten auf LB-Agarplatten überimpft und mit 5 µl einer Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bedeckt. Mutanten, die nicht innerhalb von zwei Tagen die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE komplett unterdrücken konnten (was durch den Wildtyp von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 der Fall ist), wurden in Etappe zwei nachgescreent, indem jeweils 5 µl Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und Mutanten (beide angezogen in LB-Medium) vermischt und auf Agarplatten aufgetragen wurden. In Etappe drei wurden Mutanten, die immer noch nicht die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE innerhalb von zwei Tagen komplett unterdrücken konnten, in Dual Culture Tests mit gleicher Zellzahl nachgescreent und die Entwicklung der Biolumineszenz über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet. Beispielhafte Bilder für das Screenen der Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Etappe eins und zwei sind in Abbildung 3.3.2.1, A und B zu finden.

Insgesamt konnten für *P. fluorescens* A506 sechs Mutanten (#8-42, #19-56, #29-60, #37-54, #39-55, #96-6-175) ermittelt werden, die aufgetragen auf LB-Medium in gleicher Zellzahl mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (je 1×10^7 Zellen in LB-Medium) nur noch eine eingeschränkte Hemmung gegenüber dem autobiolumineszenten Feuerbranderreger aufwiesen (siehe Abb. 3.3.2.2 A). Durch Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und der Bestimmung der RLUs konnte berechnet werden, inwieweit die Mutanten im Vergleich zum Dual Culture Test von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit den Wildtypen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 eine verminderte Hemmung aufwiesen. Die gemessene Biolumineszenz für *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Abwesenheit der Antagonisten und ihrer Mutanten wurde dabei für die jeweiligen Messtage auf 100% gesetzt. Aus diesem Wert wurde berechnet, wie stark die Biolumineszenz in Anwesenheit von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und ihrer Mutanten im Laufe der Messung reduziert wurde.

Für die Mutanten von *P. fluorescens* A506 konnte dabei im Vergleich zum Wildtyp an Tag 1 der Messung eine um 5-72% verminderte Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden, an Tag 2 der Messung eine um 6-45% verminderte Hemmung. Insbesondere Mutante #8-42 stellte sich dabei mit einer nur noch geringen Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf LB-Medium heraus (siehe Tabelle 3.3.2.1).

Für *P. fluorescens* Bk3 konnten hingegen insgesamt 40 Mutanten mit verminderter Hemmung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE detektiert werden. Zurückzuführen auf die verwendete Methodik der Konjugation (siehe 2.10.2) hat der Integrationsort der Mutagenese bei einzelnen Mutanten allerdings am selben Genort stattgefunden und es gab prinzipiell nur

fünf unterschiedliche Insertionsmutanten (#1-15, #8-15, #8-28, #13-17, #16-22) (siehe Abb. 3.3.2.2 B).

Im Vergleich zum Dual Culture Test mit dem Wildtyp von *P. fluorescens* Bk3 zeigten diese Mutanten eine um 73-144% verminderte Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE an Tag 1 der Messung, sowie um 15-139% schlechtere an Tag 2 (Werte >100% ergaben sich aus einer stärkeren gemessenen Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der Mutanten im Vergleich zur Kultur ohne Antagonist, was neben der herabgesetzten Hemmung möglicherweise auf ein stärkeres Verlaufen der auf die Agarplatten aufgespotteten Dual Culture-Ansätze und damit ein flächigeres Anwachsen der Zellen zurückzuführen sein könnte). Die schlechteste Hemmung wurde für Mutante #16-22 gemessen (Tabelle 3.3.2.1).

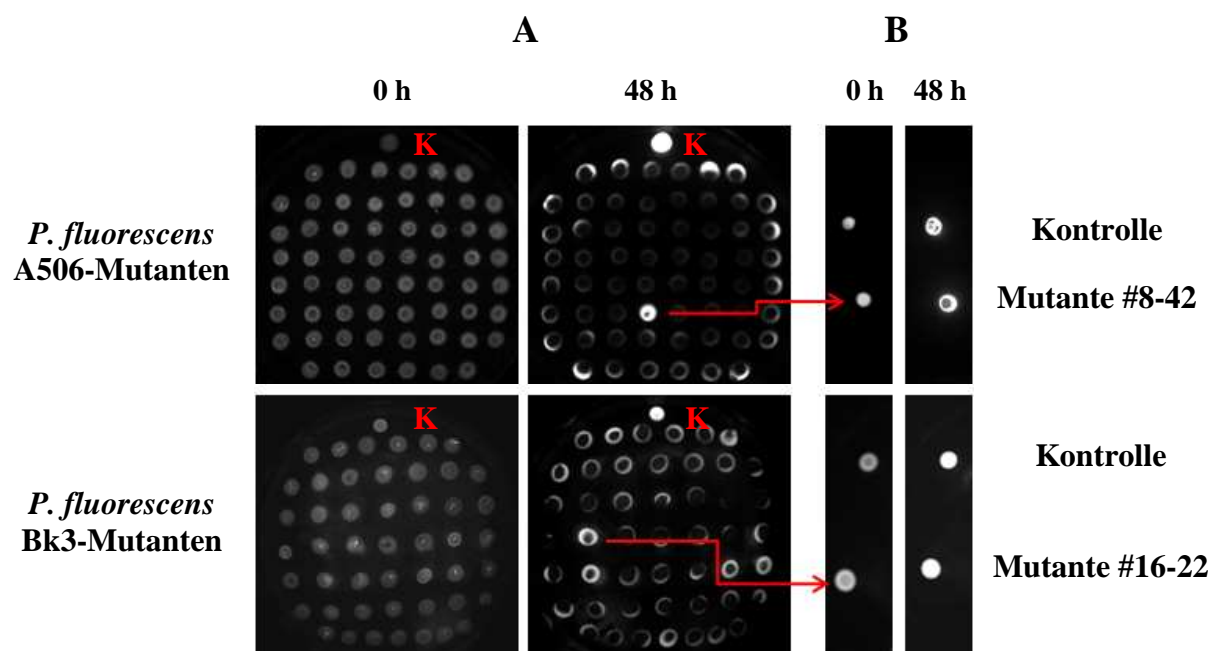


Abb. 3.3.2.1 Vorscreening der Insertionsmutanten von *P. fluorescens* A506 (Screening für Mutante #8-42) und Bk3 (Mutante #16-22). **A** Etappe eins des Vorscreenings. Die Mutanten wurden gepickt, auf LB-Agarplatten übertragen und mit 5 µl Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bedeckt. **B** Etappe zwei des Vorscreenings. Je 5 µl Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und Mutante von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 wurden vermischt und punktförmig auf LB-Agar aufgetragen. K= Kontrolle, 5 µl Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ohne Mutante. Messung der Biolumineszenz nach 0 und 48 Stunden (Belichtungszeit 5 sec, Gain 3, Binning 4 x 4).

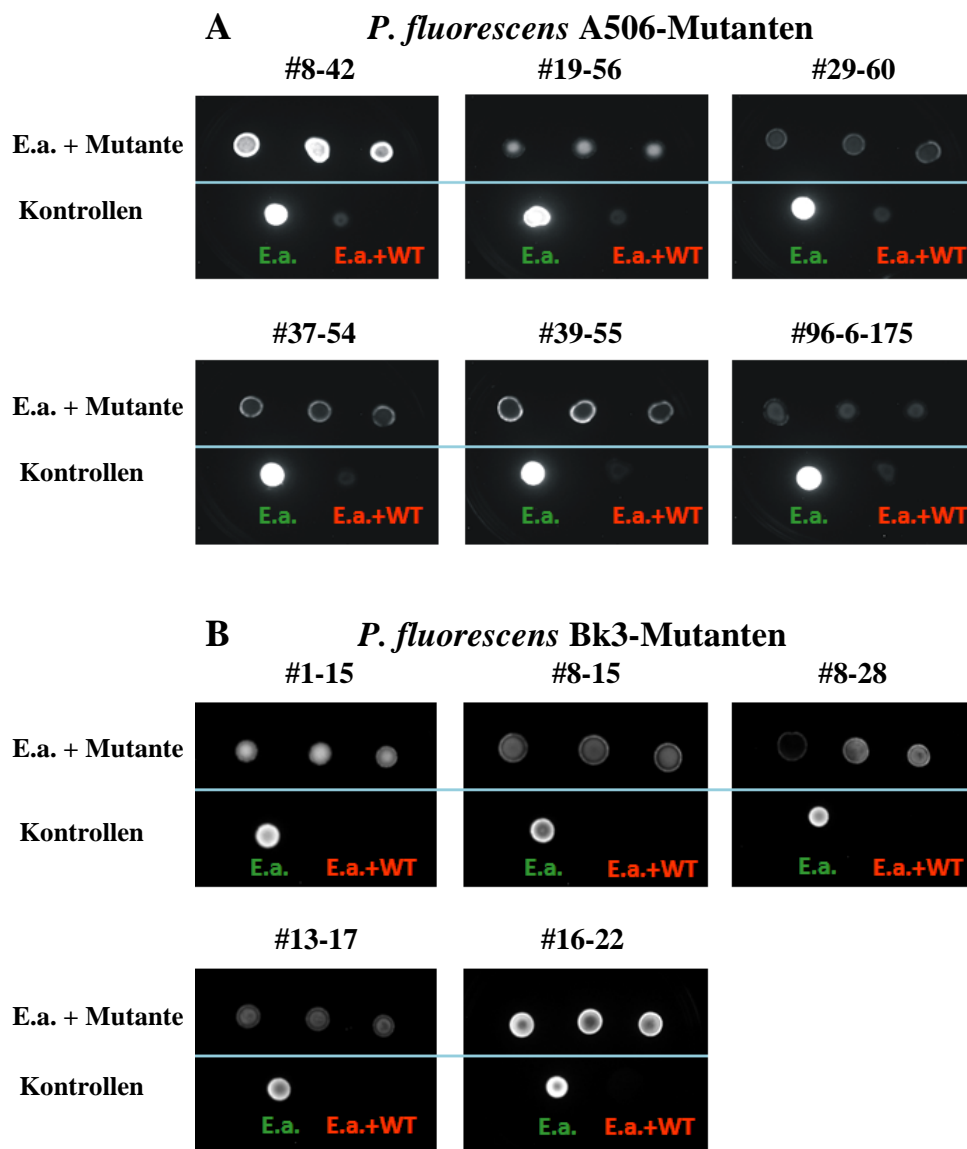


Abb. 3.3.2.2 Screening der Insertionsmutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 im Dual Culture Test mit gleicher Zellzahl. **A** *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) in Gegenwart der Mutanten von *P. fluorescens* A506. **B** *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der Mutanten von *P. fluorescens* Bk3. Je Ansatz wurden jeweils 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und den Mutanten vermischt (in einem Endvolumen von 10 μ l LB-Medium) und auf LB-Agarplatten gespottet. **Kontrollen** E.a.: 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, E.a. + WT: 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit 1×10^7 Zellen des Wildtyps von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Messung der Biolumineszenz nach 48 Stunden (Belichtungszeit 5 sec, Gain 3, Binning 4 x 4).

Mit den in Tabelle 3.3.2.1 aufgeführten Mutanten wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Ihr Wachstumsverhalten in LB- und M9-Medium im Vergleich zum Wildtyp wurde untersucht, die extrazelluläre Proteinzusammensetzung mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert, die biologische Kontrollkapazität von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf Minimalmedium getestet sowie der Integrationsort der Mutagenese bestimmt.

Tab. 3.3.2.1 Auswertung der Dual Culture Tests mit je 1×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und den *P. fluorescens* A506- und Bk3-Mutanten (Mutante #x) sowie dem Wildtyp von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (Wildtyp A506/Bk3). Die gemessene Biolumineszenz (nach 24 und 48 Stunden) von *E. amylovora*::TnluxCDABE in Gegenwart des Wildtyps und der Mutanten wurde prozentual auf die gemessene Biolumineszenz von *E. amylovora*::TnluxCDABE (bei alleinigem Auftrag auf LB-Agar, dieser Wert wurde auf 100% gesetzt) bezogen.

| relative Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE in Gegenwart von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Stamm | nach 24 Stunden [%] | nach 48 Stunden [%] |
| <i>P. fluorescens</i> A506 | | |
| Wildtyp | 3 | 4 |
| Mutante #8-42 | 75 | 49 |
| Mutante #19-56 | 19 | 36 |
| Mutante #29-60 | 13 | 21 |
| Mutante #37-54 | 16 | 6 |
| Mutante #39-55 | 17 | 20 |
| Mutante #96-6-175 | 8 | 10 |
| <i>P. fluorescens</i> Bk3 | | |
| Wildtyp | 1 | 1 |
| Mutante #1-15 | 84 | 56 |
| Mutante #8-15 | 74 | 22 |
| Mutante #8-28 | 91 | 50 |
| Mutante #13-17 | 88 | 16 |
| Mutante #16-22 | 145 | 140 |

3.3.3 Detektion des Integrationsortes des Transposons bei den *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3-Mutanten

Im Rahmen dieser Arbeit sind Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 erstellt und auf eine reduzierte inhibitorische Wirkung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE untersucht worden.

Aus den Mutanten mit eingeschränkter inhibitorischer Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurde genomische DNA isoliert und mit *EcoRV* bzw. *BglII* gespalten. Bei Mutanten von *P. fluorescens* A506 wurden die Fragmente der genomischen DNA in das Vektorsystem pBluescript SK überführt, bei *P. fluorescens* Bk3 wurden die Fragmente religiert. Nach der Transformation der erstellten Vektoren in *E. coli* λ -pir-Stämme wurden diese auf Kanamycin-Resistenz gescreent, da im Zuge der Mutagenese das *nptII*-Gen ins Genom von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 übertragen worden ist. Aus Kanamycin-resistenten *E. coli*s wurden die Plasmide reisoliert und sequenziert. Zur Auswertung der Sequenzen ist ein Blastn auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> durchgeführt worden.

Detektion des Integrationsortes des Transposons bei *P. fluorescens* A506-Mutanten

Wie aus der Gelelektrophorese ersichtlich wurde, konnte die Isolierung der genomischen DNA aus den Mutanten *P. fluorescens* A506 #8-42, #19-56, #29-60, #37-54, #39-55 und #96-6-175 erfolgreich mit dem unter 2.13 beschriebenen Protokoll durchgeführt werden (Abb. 3.3.3.1 links). Die isolierte genomische DNA lief knapp oberhalb der 23 kb Bande des Markers λ HindIII.

Nach Restriktionsenzymbehandlung der genomischen DNA mit *EcoRV* ergab eine vollständige Spaltung aller Proben, was durch eine Gelelektrophorese gezeigt werden konnte. Die gespaltene genomische DNA stellt sich als Schmier auf dem Agarosegel dar (Abb. 3.3.3.1, rechts).

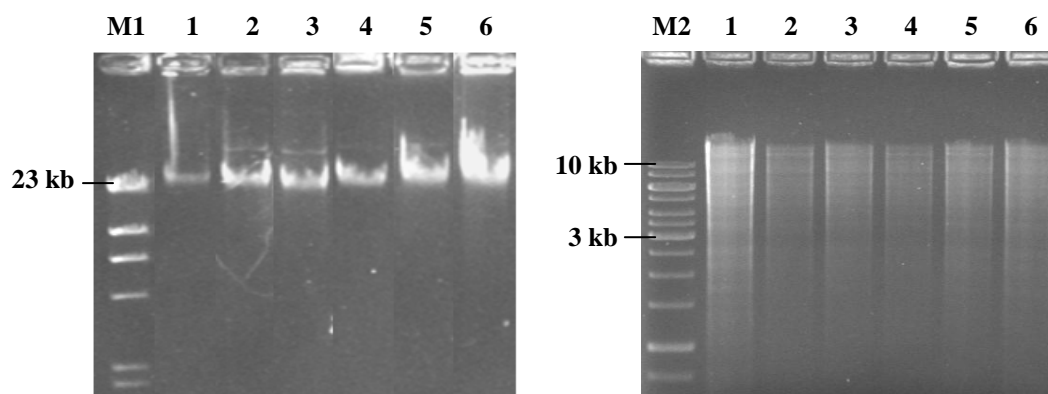


Abb. 3.3.3.1 Gelelektrophorese der genomischen DNA von *P. fluorescens* A506-Mutanten **Links** isolierte genomische DNA der *P. fluorescens* A506-Mutanten, 0,8%iges Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung. Marker (M1) = λ HindIII, Fermentas. **Rechts** *EcoRV*-gespaltene genomische DNA der *P. fluorescens* A506-Mutanten, 1%iges Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 3 μ g der isolierten genomischen DNA, bzw. 5 μ l der Spaltung. Marker (M2) = Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder, Fermentas. 1 = #8-42, 2 = #19-56, 3 = #29-60, 4 = #37-54, 5 = #39-55, 6 = #96-6-175.

Nach der *EcoRV*-Spaltung sind die Fragmente der genomischen DNA der *P. fluorescens* A506-Mutanten in einen ebenfalls *EcoRV*-gespaltenen und anschließend dephosphorylierten Vektor (pBluescript SK) ligiert worden. Jeweils 5 μ l der Ligationsansätze sind in elektrokompente *E. coli* DH5 α mcr per Elektroporation übertragen worden.

Die Selektion der Transformation erfolgte über Ausplattieren der Transformationsansätze auf LB-Agarplatten mit 50 μ g/ml Kanamycin.

Für die Transformationsansätze mit Fragmenten der genomischen DNA der Mutanten #8-42, #19-56, #29-60, #37-54 und #96-6-175 konnten Kanamycin-resistente *E. coli* DH5 α mcr-Transformanten generiert werden. Für Mutante #39-55 ist dies – auch unter Verwendung anderer Restriktionsenzyme für die Spaltung der genomischen DNA – nicht möglich gewesen.

Aus Übernachtskulturen der Kanamycin-resistenten *E. coli* DH5 α mcr-Transformanden sind mittels HB-Lyse (siehe 2.12.1) die generierten Plasmide isoliert und anschließend zur Überprüfung der Insertgröße (in pBluescript SK klonierte Fragmente der genomischen DNA der *P. fluorescens* A506-Mutanten) mit *EcoRV* gespalten worden.

Die isolierten Plasmide wiesen unterschiedliche Größen zwischen 10 kb und mehr als 13 kb auf (keine Abb.). Mittels *EcoRV*-Spaltung ist es möglich gewesen, das klonierte Insert aus pBluescript SK herauszuspalten und die Größe abzuschätzen (siehe Abb. 3.3.3.2 und Tabelle 3.3.3.1). pBluescript SK fiel bei der Spaltung als 3 kb großes Fragment heraus (Abb. 3.3.3.2, roter Pfeil).

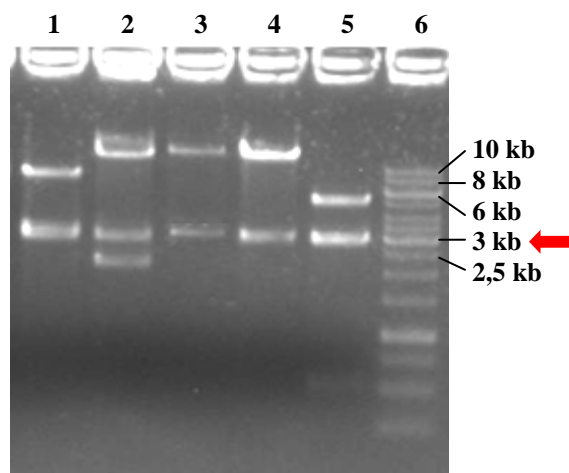


Abb. 3.3.3.2 Gelelektrophorese der aus *E. coli* DH5 α mcr isolierten, mit *EcoRV* gespaltenen Plasmide mit Inserts genomischer DNA der *P. fluorescens* A506-Mutanten. 1%iges Agarosegel. Aufgetragen wurden jeweils 5 μ l gespaltenes Plasmid. Spur 1: #8-42, Spur 2: #19-56, Spur 3: #29-60, Spur 4: #37-54, Spur 5: #96-6-175, Spur 6: 1 kb DNA-Ladder, Fermentas.

Die klonierten Inserts zeigten Größen zwischen 6 und 12 kb. Das *nptII*-Resistenzgen, das zusammen mit genomischer DNA der *P. fluorescens* A506-Mutanten kloniert worden ist, hat eine Größe von ca. 1 kb. Die Größe der klonierten Fragmente der genomischen DNA der *P. fluorescens* A506-Mutanten beträgt damit geschätzt zwischen 5 und 11 kb (Tabelle 3.3.3.1).

Die Sequenzierung der Inserts erfolgte durch SeqLab Sequence Laboratories in Göttingen.

Mit den ermittelten Sequenzen ist ein Blastn auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (NCBI) durchgeführt worden, bei dem die ermittelten Sequenzen mit einer Nukleotid-Datenbank verglichen worden sind. Die Ergebnisse dieser Blastns sind ebenfalls in Tabelle 3.3.3.1 aufgeführt.

Tab. 3.3.3.1 Ergebnisse des NCBI-Blasts (Blastn) mit den durch SEQLAB Sequence Laboratories ermittelten Sequenzen, die den Integrationsort der Mutation bei den *P. fluorescens* A506-Mutanten flankieren. Der Abgleich erfolgte mit der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

| Mutante | Größe | homolog zu | Ursprung | max. Identität | E-Value | Acession No. + Gene ID |
|-----------|-------|-------------------------------------|-----------------------------|----------------|---------|------------------------|
| #8-42 | 8 kb | Phospho-glukosamin-Mutase | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 83% | 0.0 | CP000094.1 3715232 |
| #19-56 | 11 kb | Kalium-Uptake-Protein | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 87% | 0.0 | CP000076.1 3476496 |
| #29-60 | 11 kb | Citrat-Synthase | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 94% | 0.0 | CP000094.1 3716821 |
| #37-54 | 11 kb | Kationen ABC-Transporter | <i>P. fluorescens</i> SBW25 | 91% | 1e-116 | AM181176 7818324 |
| #96-6-175 | 5 kb | Schwermetall Sensor-Histidin-Kinase | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 76% | 3e-148 | CP000076.1 3475981 |

Mutante *P. fluorescens* A506 #8-42 zeigte die geringste Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Dual Culture Test (siehe 3.3.2). Durch die Integrationsmutagenese ist bei dieser Mutante das Gen für eine Phosphoglukosamin-Mutase (GeneID: 3715232) unterbrochen worden; dieses Enzym ist an der Synthese von Peptidoglycan und Lipopolysaccharid beteiligt und hat damit eine wichtige Funktion beim Aufbau der bakteriellen Zellwand.

In *P. fluorescens* Pf0-1 befindet sich das betroffene Gen in einem Operon, in dem nachfolgend eine Triosephosphat-Isomerase und eine SecG Preprotein Translokase liegen. Es ist möglich, dass bei *P. fluorescens* A506 auch diese nachfolgend geschalteten Gene durch die Insertionsmutagenese betroffen sind.

Bei *P. fluorescens* A506 #19-56 konnte die Integration des Transposons in einem Gen für ein Kalium-Uptake-Protein (Gene ID: 3476497) festgestellt werden. Dieses integrale Membranprotein hat eine Transmembran-Transporter-Aktivität und kann unter anderem für eine Regulation der Zellosmolarität zuständig sein.

In *P. fluorescens* Pf-5 konnte das Gen keinem bestimmten Operon zugeordnet werden.

Bei *P. fluorescens* A506 #29-60 ist das Gen für die Citrat-Synthase (Gene ID: 3716821) durch das Transposon unterbrochen worden. Dieses Enzym kondensiert Acetyl-CoA und Oxalacetat in Gegenwart von Wasser zu Citrat, wobei als Nebenprodukt CoA entsteht. Demnach ist eine Vorstufe zum Citratzyklus betroffen, d.h. dieser Mutante ist eine effektive Energiegewinnung nur eingeschränkt möglich.

Das Gen konnte für *P. fluorescens* Pf0-1 keinem bestimmten Operon zugeordnet werden.

Bei *P. fluorescens* A506 #37-54 wurde durch das Transposon ein Gen für einen Kationen-ABC-Transporter (Gene ID: 7818324) unterbrochen. Diese Transportproteine ermöglichen einen Im- und Export von Kationen und könnten unter anderem für eine Regulation der Zellosmolarität zuständig sein.

In *P. fluorescens* Pf-5 liegen diesem Gen in einem Operon nachgeschaltet ein Membranprotein, ein Kationen ABC-Transporter, ein periplasmatisches Kationen-Bindeprotein, eine Phosphoribosyl-AMP-Cyclohydrolase, eine Anhydrase (Familie 3) und eine Threonyl-tRNA Synthetase. Es ist möglich, dass bei *P. fluorescens* A506 auch diese Gene nachfolgend geschaltet, und ebenfalls durch die Insertionsmutagenese betroffen sind.

Bei Mutante *P. fluorescens* A506 #96-6-175 konnte die Integration der Mutation in einem Gen für eine Schwermetall-Sensor Histidin-Kinase (GeneID: 3475982) festgestellt werden. Diese membranständigen Proteine können zum einen Schwermetalle detektieren, aber auch eine Autophosphorylierung katalysieren und damit Signaltransduktion bewirken.

Bei *P. fluorescens* Pf-5 liegen diesem Gen keine weiteren Gene des Operons in Leserichtung nachgeschaltet, die durch die Mutagenese auch betroffen sein könnten.

Detektion des Integrationsortes des Transposons bei *P. fluorescens* Bk3-Mutanten

Insgesamt konnte aus 40 Mutanten von *P. fluorescens* Bk3 mit eingeschränkter inhibitorischer Aktivität gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE die genomische DNA isoliert werden. Die DNA lief bei der anschließenden Gelelektrophorese in etwa auf Höhe der 23 kb Bande des λ HindIII-Markers, wurde anschließend mittels einer BglIII-Spaltung fragmentiert und eine Ligase-Behandlung durchgeführt, bei der die einzelnen Fragmente selbst-ligiert worden und auf diesem Weg Plasmide unterschiedlicher Größe entstanden sind (keine Abbildungen gezeigt).

Die re-ligierten Plasmide sind per Elektroporation in *E. coli* DH5 α -pir transformiert und die Transformanten auf eine Kanamycin-Resistenz hin selektiert worden.

Für nahezu alle Transformationsansätze mit Fragmenten der genomischen DNA der Mutanten konnten Kanamycin-resistente *E. coli* DH5 α -pir generiert werden.

Eine Isolierung der Plasmid-DNA aus diesen Bakterien zeigte Plasmide mit geschätzten Größen zwischen 2 und mehr als 23 kb (Abb. 3.3.3.3).

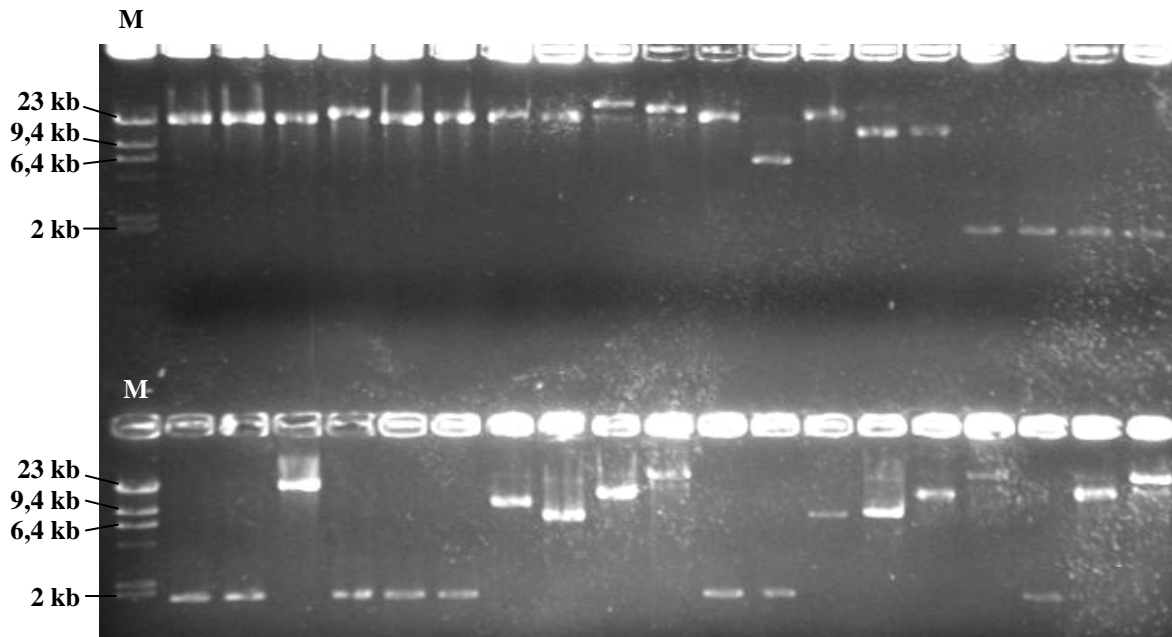


Abb. 3.3.3.3 Plasmid-Präparation aus *E. coli* DH5αλ-pir-Transformanten mit Plasmiden aus genomischer DNA der *P. fluorescens* Bk3-Mutanten. Von der isolierten Plasmid-DNA wurden jeweils 5 µl aufgetragen. 1%iges Agarosegel. M= λHindIII-Marker, Fermentas. Die Größe jedes Plasmids wurde abgeschätzt und jedes Plasmid mit den Primern tpnRL17 und tpnRL13 sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 3.4.2.2 zu finden. Spur 1 auf dem Gel entspricht dabei den ersten beiden Zeilen der Tabelle, Spur 2 Zeile 3 und 4, usw.

Die Plasmid-DNA wurde von SeqLab Sequence Laboratories in Göttingen sequenziert; die durch SeqLab ermittelten Sequenzen sind im Anhang zu finden.

Mit den ermittelten Sequenzen ist ein Blastn auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (NCBI) durchgeführt worden, bei dem die ermittelten Sequenzen mit einer Nukleotid-Datenbank verglichen worden sind. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 3.3.3.2 aufgeführt.

Tab. 3.3.3.2 Ergebnisse des NCBI-Blasts (Blastn) mit den durch SEQLAB Sequence Laboratories ermittelten Sequenzen, die den Integrationsort der Mutation bei den *P. fluorescens* Bk3-Mutanten flankieren. Der Abgleich erfolgte mit der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

| Mutante | Größe | homolog zu | Ursprung | max. Identität | E-Value | Acession/ Gene ID |
|---------------|-------|------------------|-----------------------------|----------------|---------|----------------------|
| #1-15 tpnRL17 | 23 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 85% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #1-15 tpnRL13 | 23 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 88% | 0.0 | CP000076 3480650 |
| #1-56 tpnRL17 | 23 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 87% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #1-56 tpnRL13 | 23 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 87% | 0.0 | CP000076 3480650 |
| #1-72 tpnRL17 | 23 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 84% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #1-72 tpnRL13 | 23 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 87% | 0.0 | CP000094 3480650 |
| #2-5 tpnRL17 | 24 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 86% | 0.0 | CP000094 3717789 |

| Mutante | Größe | homolog zu | Ursprung | max. Identität | E-Value | Acession/ Gene ID |
|---------------|-------|----------------------------------------|-----------------------------|----------------|---------|----------------------|
| #2-5 tpnRL13 | 24 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 88% | 0.0 | CP000076 3480650 |
| #2-7 tpnRL17 | 23 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 84% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #2-7 tpnRL13 | 23 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 87% | 0.0 | CP000076 3480650 |
| #2-36 tpnRL17 | 23 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 85% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #2-36 tpnRL13 | 23 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 86% | 0.0 | CP000076 3480650 |
| #2-38 tpnRL17 | 24 kb | Oligopeptidase A Metallo Peptidase | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 85% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #2-38 tpnRL13 | 24 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 86% | 0.0 | CP000076 3480650 |
| #2-46 tpnRL17 | 24 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 84% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #2-46 tpnRL13 | 24 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 87% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #2-47 tpnRL17 | 30 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 87% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #2-47 tpnRL13 | 30 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 87% | 0.0 | CP000076 3480650 |
| #2-62 tpnRL17 | 26 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 86% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #2-62 tpnRL13 | 26 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 87% | 0.0 | CP000076 3480650 |
| #3-21 tpnRL17 | 24 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 85% | 0.0 | CP000094 3717789 |
| #3-21 tpnRL13 | 24 kb | Oligopeptidase A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 87% | 0.0 | CP000076 3480650 |
| #7-56 tpnRL17 | 16 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 87% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #7-56 tpnRL13 | 16 kb | GTP-binding Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 86% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #8-15 tpnRL17 | 16 kb | DEAD/DEAH- Box Helikase- ähnlich | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 87% | 0.0 | CP000094 3714013 |
| #8-15 tpnRL13 | 16 kb | DEAD/DEAH- Box Helikase- ähnlich | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 88% | 0.0 | CP000094 3714013 |
| #8-22 tpnRL17 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 92% | 0.0 | CP000076 3480979 |
| #8-22 tpnRL13 | 2 kb | GTP-binding Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 90% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #8-28 tpnRL17 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 90% | 0.0 | CP000076 3480979 |
| #8-28 tpnRL13 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 90% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #12-2 tpnRL17 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 92% | 0.0 | CP000076 3480979 |
| #12-2 tpnRL13 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 91% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #12-4 tpnRL17 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 90% | 0.0 | CP000094 3713375 |

| Mutante | Größe | homolog zu | Ursprung | max. Identität | E-Value | Acession/ Gene ID |
|----------------|--------|--------------------------------|-----------------------------|----------------|---------|-----------------------|
| #12-4 tpnRL13 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 90% | 4e-172 | CP000076 3480979 |
| #12-16 tpnRL17 | 1,8 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 89% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #12-16 tpnRL13 | 1,8 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 91% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #12-84 tpnRL17 | 1,8 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 90% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #12-84 tpnRL13 | 1,8 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 91% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #13-17 tpnRL17 | 23 kb | RNAse T | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 85% | 0.0 | CP000094 3717889 |
| #13-17 tpnRL13 | 23 kb | RNAse T | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 86% | 0.0 | CP000094 3717889 |
| #14-13 tpnRL17 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 90% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #14-13 tpnRL13 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 92% | 0.0 | CP000076 3480979 |
| #14-59 tpnRL17 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 90% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #14-59 tpnRL13 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 92% | 0.0 | CP000076 3480979 |
| #15-50 tpnRL17 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 89% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #15-50 tpnRL13 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 92% | 0.0 | CP000076 3480979 |
| #16-22 tpnRL17 | 9,4 kb | Thiamin Biosynthese Protein | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 92% | 0.0 | CP000094 3713374 |
| #16-22 tpnRL13 | 9,4 kb | Thiamin Biosynthese Protein | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 88% | 0.0 | CP000076 3480978 |
| #17-15 tpnRL17 | 23 kb | DEAD/DEAH-Box Helikase-ähnlich | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 88% | 0.0 | CP000094 3714013 |
| #17-15 tpnRL13 | 23 kb | Helikase, DEAD/DEAH-Box | <i>P. syringae</i> B728a | 90% | 0.0 | CP000075.1 3369154 |
| #17-86 tpnRL17 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 90% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #17-86 tpnRL13 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 90% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #18-81 tpnRL17 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 89% | 0.0 | CP000094 3713375 |
| #18-81 tpnRL13 | 2 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 92% | 0.0 | CP000076 3480979 |
| #22-4 tpnRL17 | 1,8 kb | GTP- bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 | 92% | 0.0 | CP000076 3480979 |
| #22-4 tpnRL13 | 1,8 kb | GTP-bindendes Protein Typ A | <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 | 89% | 0.0 | CP000094 3713375 |

Bedingt durch die Methodik der Mutagenese von *P. fluorescens* Bk3 via Konjugation konnten für die Integrationsorte der Transposons bei den *P. fluorescens* Bk3-Mutanten Übereinstimmungen gefunden werden.

Insgesamt 11 Mutanten zeigten eine Integration des Transposons im Gen für die Oligopeptidase A.

Bei 14 Mutanten konnte die Integration des Transposons im Gen für ein GTP-bindendes Protein Typ A festgestellt werden.

Bei zwei Mutanten erfolgte die Integration des Transposons in ein Gen für ein DEAD/DEAH-Box Helikase-ähnliches Protein.

Bei einer Mutante liegt der Integrationsort im Gen für eine RNase T.

Bei einer weiteren Mutante liegt der Integrationsort in einem Gen für das Thiamin Biosynthese Protein.

Auf Grund der Übereinstimmungen im Integrationsort sind 5 Mutanten ausgewählt worden, mit denen weiter gearbeitet worden ist. Bei diesen Mutanten handelt es sich um #1-15, #8-15, #8-28, #13-17 und #16-22.

Bei Mutante *P. fluorescens* Bk3 #1-15 ist der Integrationsort des Transposons im Gen für die Oligopeptidase A (GeneID: 3717789) festgestellt worden. Dieses cytoplasmatische Enzym hydrolysiert Oligopeptide mit einer breiten Spezifität und benötigt als Co-Faktor Zinkionen; möglicherweise ist es an der Degradierung von Signalpeptiden beteiligt. Sowohl bei *P. fluorescens* Pf0-1 als auch bei *P. fluorescens* Pf-5 liegt das Gen für die Oligopeptidase A in einem Operon mit bislang unbekannten Proteinen.

Bei Mutante *P. fluorescens* Bk3 #8-15 betrifft der Integrationsort des Transposons das Gen für ein DEAD/DEAH-Box Helikase-ähnliches Protein (GeneID: 3714013). Helikasen sind an vielen Aspekten von RNA-Metabolismus, Transkription, prä-mRNA-Splicing, Biosynthese der Ribosomen, Translation, RNA-Zersetzung und Genexpression beteiligt. Die Helikase-Funktion ist ATP-abhängig. In *P. fluorescens* Pf0-1 liegt dieses Gen zwischen Genen für die Untereinheit III einer Dioxxygenase und einer Enoyl-CoA-Hydratase. Beide Gene sind entgegen gesetzt zur Leserichtung des hier von der Mutation betroffenen Gens.

In Mutante *P. fluorescens* Bk3 #8-28 ist ein Gen für ein GTP-bindendes Protein Typ A (GeneID: 3713375) durch das Transposon betroffen. GTP-bindende Typ A Proteine sind im Zusammenhang mit einer Stressantwort beschrieben und haben damit möglicherweise eine Funktion in der Signaltransduktion.

Bei *P. fluorescens* Pf0-1 liegen diesem Gen im Operon keine weiteren Gene in gleicher Leserichtung nachgeschaltet, die durch die Mutation betroffen sein könnten.

Das GTP-bindende Protein Typ A hat allerdings auch Homologien zu der „Leader Peptidase A“ (LepA, GeneID: 7816346), wobei es sich um einen Elongationsfaktor handelt, der mis-translozierte tRNA detektieren und eine Rück-Translokation einleiten kann. LepA hat eine hoch-konservierte Sequenz, Orthologe kommen in Bakterien und nahezu allen Eukaryonten mit funktionellen Mitochondrien vor.

Bei Mutante *P. fluorescens* Bk3 #13-17 ist der Integrationsort des Transposons im Gen für eine RNase T (GeneID: 3717889) festgestellt worden.

Die RNase T katalysiert den letzten Schritt in der Synthese von tRNA, indem sie das CCA 3' Ende der tRNA erzeugt, an das später Aminosäuren zum Transport angeknüpft werden.

In Mutante *P. fluorescens* Bk3 #16-22 ist das Gen für ein Thiamin-Biosynthese-Protein (GeneID: 37133734) von der Mutation betroffen.

Dieses Protein ist an der Biosynthese von Thiamin oder auch Vitamin B1 beteiligt. Thiamin wiederum ist ein essentielles Coenzym, das in Zellen meist in der Form Thiamin-Pyrophosphat vorliegt und eine Rolle beim Aldehydgruppen-Transfer spielt.

Bei *P. fluorescens* Pf0-1 liegt dem Gen ein Gen für das GTP-bindende Protein RypA nachgeschaltet, das durch den Integrationsort der Mutation möglicherweise auch mitbetroffen ist.

3.4 Aufnahme von Wachstumskurven des Wildtyps und der Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie *E. amylovora* 222

Im Rahmen dieser Arbeit sind Wachstumskurven von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, den Wildtypen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie den in dieser Arbeit erzeugten Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 aufgenommen worden.

Mit Hilfe der Wachstumskurven sollte ein Vergleich im Wachstums- und Nährstoffverwertungsverhalten zwischen den Wildtypen und Mutanten der *P. fluorescens*-Stämme, aber auch zwischen den Wildtypen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE stattfinden. Zusätzlich aufgenommene Wachstumskurven mit einer parallelen Messung der Biolumineszenz des autolumineszenten *E. amylovora*-Stammes 222::TnluxCDABE in An- und Abwesenheit des Wildtyps und der biolumineszenten Stämme von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (::TngfluxAB) ermöglichten eine Aussage über den Stoffwechselstatus der Bakterien zu den jeweiligen Messpunkten. Alle Ansätze sind in Tabelle 3.4.1 aufgeführt.

Tab. 3.4.1 Medien zur Aufnahme von Wachstumskurven für *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, *P. fluorescens* A506 (Wildtyp und Mutante #8-42, #19-52, #29-60, #37-54, #39-55, #96-6-175) und *P. fluorescens* Bk3 (Wildtyp und Mutante #1-15, #8-15, #8-28, #13-17, #16-22).

| Stamm | <i>E. amylovora</i> 222 | <i>P. fluorescens</i> A506 | | <i>P. fluorescens</i> Bk3 | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------|----------|
| | ::TnluxCDABE | Wildtyp | Mutanten | Wildtyp | Mutanten |
| Medium | | | | | |
| LB | X | X | X | X | X |
| M9 + 0,5% Glukose, 10 mM Asparagin | X | X | X | X | X |
| M9 +10 mM Asparagin | --- | X | X | X | X |
| M9 + 0,5% Glukose, 5 mM Nitrat | --- | X | X | X | X |
| M9+ 0,5% Glukose, + je 10 mM Asparaginsäure, Arginin, Prolin, Glycin o. Methionin | --- | X | nur Mutante #8-42 | --- | --- |

3.4.1 Vergleichende Wachstumskurven von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und dem Wildtyp von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Für *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und dem Wildtyp von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sind in LB-Medium und M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin Wachstumskurven aufgenommen worden, um das Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme unter Voll- (LB) und Minimalmedium- (M9) Bedingungen miteinander vergleichen zu können.

Aus den Wachstumskurven wurde ersichtlich, dass *E. amylovora* 222::TnluxCDABE sowohl in LB- als auch M9-Medium langsamer wächst als die beiden *P. fluorescens*-Stämme. *E. amylovora* 222::TnluxCDABE erreichte nach etwa 24 Stunden in LB-Medium und einer OD₆₀₀ von ca. 2,0 die stationäre Phase und ging nach 32 Stunden, erkennbar an der Abnahme der optische Dichte, in die Absterbephase über. Beide *P. fluorescens*-Stämme hatten hingegen nach 24 Stunden eine deutlich höhere OD₆₀₀ von 2,5 (A506) und 2,9 (Bk3). *P. fluorescens* Bk3 ging ebenfalls nach 32 Stunden in die Absterbephase über, hatte nach 48 Stunden aber immer noch eine OD₆₀₀ von 2,5. In Kulturen von *P. fluorescens* A506 konnte nach 48 Stunden immer noch ein leichtes Wachstum beobachtet werden; die Kulturen erreichten eine OD₆₀₀ von 2,8 (siehe Abb. 3.4.1.1).

In M9-Medium erreichte keiner der Stämme die Absterbephase innerhalb von 48 Stunden. Bei *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte nach 48 Stunden noch immer eine Zunahme der OD₆₀₀ beobachtet werden, *E. amylovora* 222::TnluxCDABE erreichte nach 24 Stunden eine OD₆₀₀

von 0,64, danach war keine maßgebliche Veränderung der optischen Dichte mehr zu beobachten.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 erreichten hingegen nach 48 Stunden eine OD₆₀₀ von 1,7 bzw. 2,0.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 unterscheiden sich insofern von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in ihrem Wachstumsverhalten, als dass sie sowohl in einem Voll- als auch einem Minimalmedium schneller anwuchsen und eine deutlich höhere OD₆₀₀ erreichten. Auch der Übergang von der stationären in die Absterbephase verlief im Vergleich zu *E. amylovora* 222::TnluxCDABE verzögert.

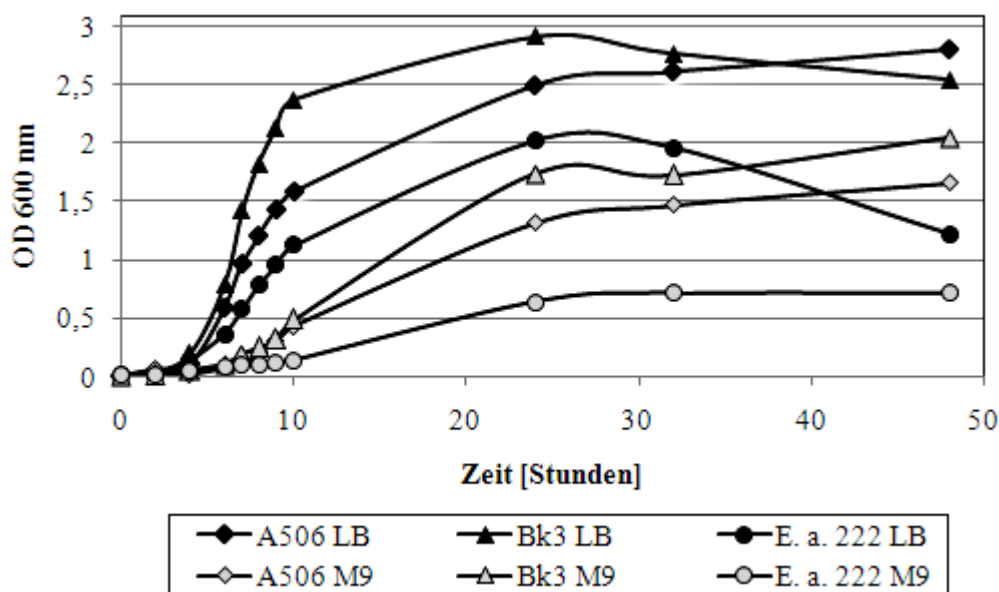


Abb. 3.4.1.1 Wachstumskurven von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E. a. 222) und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506 bzw. Bk3) in LB-Medium (LB) und M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin (M9)

3.4.2 Vergleichende Wachstumskurven des Wildtyps und der Mutanten von *P. fluorescens* A506

Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* A506 unterschieden sich in ihrem Wachstumsverhalten in LB-Medium kaum. Lediglich Mutante #8-42 zeigte ein leicht verzögertes Wachstumsverhalten (ca. 25% geringer im Vergleich zum Wildtyp nach 10 Stunden). Alle Stämme befanden sich nach 48 Stunden in der stationären Phase bei einer OD₆₀₀ von 2,6-2,8 (Abb. 3.4.2.1).

In M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin hingegen wuchs der Wildtyp am besten an, Mutante #19-56 zeigte ein deutlich verlangsamtes Wachstum und Mutante #8-42 war nicht in der Lage, in diesem Medium anzuwachsen (Abb. 3.4.2.2).

Um auszuschließen, dass Mutante #8-42 lediglich Asparagin nicht mehr als Stickstoffquelle nutzen kann, wurde dieser Stamm auch in M9-Medium mit jeweils 10 mM der Aminosäuren

Asparaginsäure, Arginin, Prolin, Methionin oder Glycin bzw. mit 5 mM Nitrat kultiviert. Auch in diesen Medien wuchs Mutante #8-42 nicht an, während der Wildtyp von *P. fluorescens* A506 alle untersuchten Aminosäuren und Nitrat mehr oder weniger effektiv als zusätzliche Stickstoffquelle nutzen konnte (keine Abbildungen gezeigt).

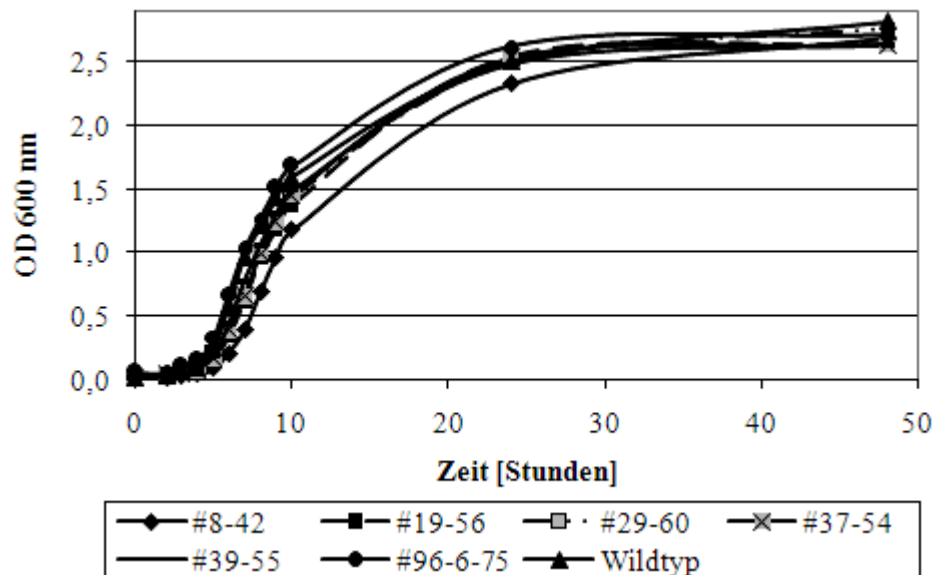


Abb. 3.4.2.1 Wachstumskurven von *P. fluorescens* A506, Wildtyp (Wildtyp) und Mutanten (#8-42, #19-56, #29-60, #37-54, #39-55, #96-6-175) in LB-Medium.

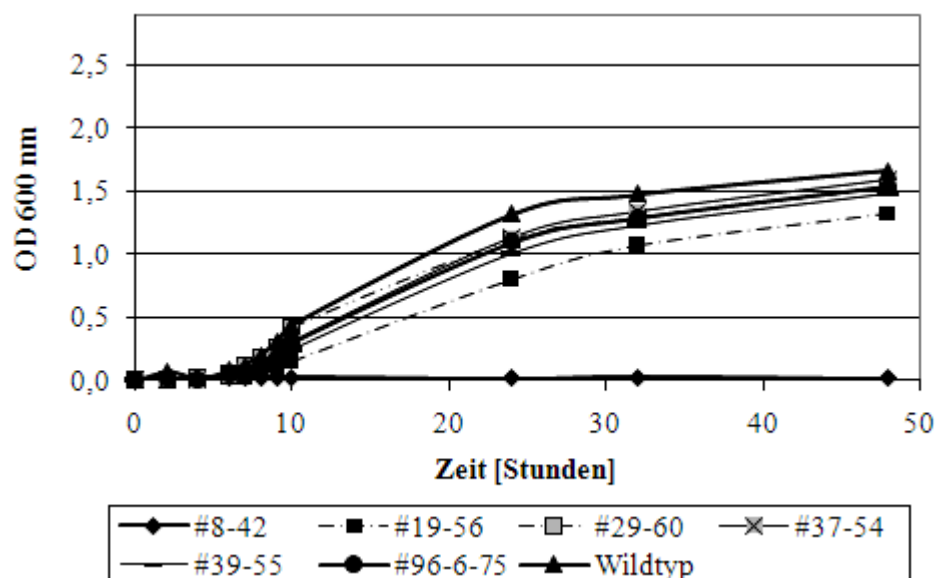


Abb. 3.4.2.2 Wachstumskurven von *P. fluorescens* A506, Wildtyp (Wildtyp) und Mutanten (#8-42, #19-56, #29-60, #37-54, #39-55, #96-6-175) in M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin.

Ohne Supplementierung mit Asparagin enthält M9-Medium nur Ammonium als anorganische Stickstoffquelle. Sowohl Wildtyp als auch Mutanten von *P. fluorescens* A506 (ausgenommen #8-42) konnten aber bei Zusatz von 10 mM Asparagin dieses als alleinige Kohlen- und organische Stickstoffquelle nutzen. Interessanterweise wuchsen einige der Mutanten unter den gegebenen Bedingungen schneller an als der Wildtyp. Die nach 48 Stunden erreichte optische Dichte lag allerdings in einem relativ engen Bereich zwischen OD₆₀₀ 0,35 und 0,47 bei Kultivierung in M9-Medium mit Asparagin, wobei der Wildtyp eine OD₆₀₀ von 0,4 hatte (Abb. 3.4.2.3). Ähnlich verhielten sich Wildtyp und Mutanten in M9-Medium mit 0,5% Glukose und Nitrat als zusätzliche anorganische Stickstoffquelle. Die Bakterien erreichten hier eine höhere OD₆₀₀ zwischen 0,82 und 1,27 im Vergleich zum Medium, das nur mit Asparagin supplementiert worden ist, wobei der Wildtyp eine OD₆₀₀ von 0,82 gezeigt hat (Abb. 3.4.2.4).

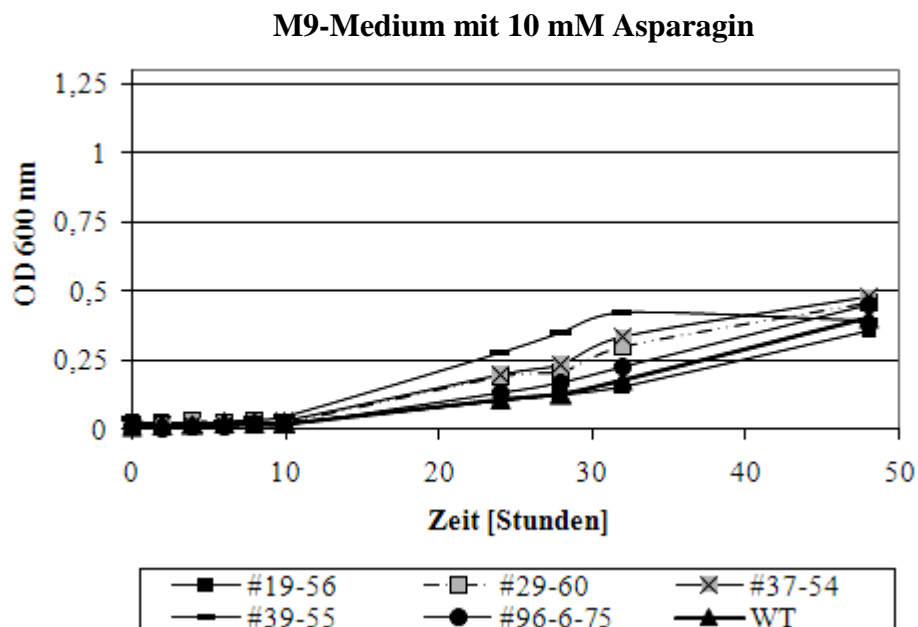


Abb. 3.4.2.3 Wachstumskurven von *P. fluorescens* A506, Wildtyp (WT) und Mutanten (#19-56, #29-60, #37-54, #39-55, #96-6-175) in M9-Medium mit 10 mM Asparagin.

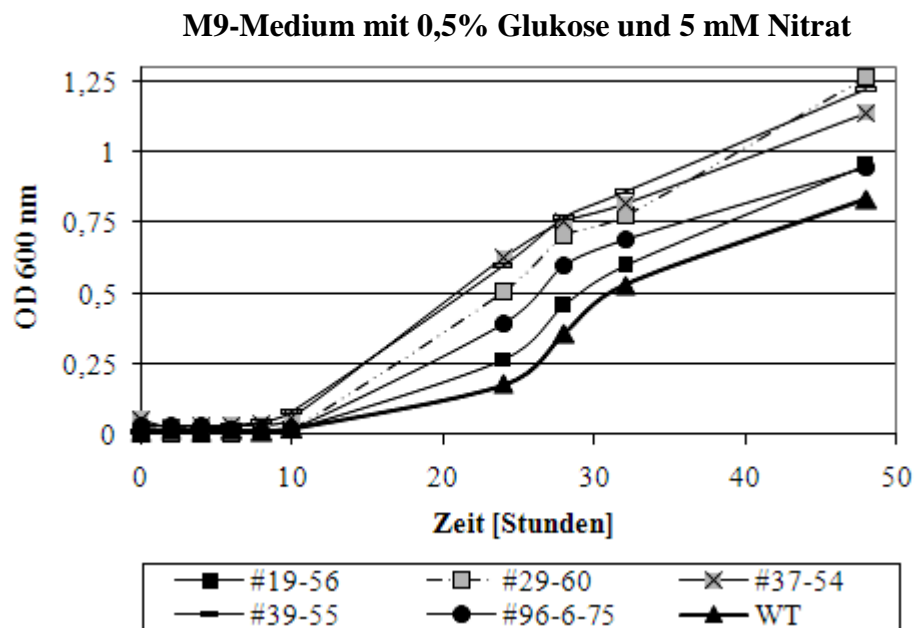


Abb. 3.4.2.4 Wachstumskurven von *P. fluorescens* A506, Wildtyp (WT) und Mutanten (#19-56, #29-60, #37-54, #39-55, #96-6-175) in M9-Medium mit 0,5% Glukose und 5 mM Nitrat.

3.4.3 Vergleichende Wachstumskurven des Wildtyps und der Mutanten von *P. fluorescens* Bk3

Die Mehrzahl der Mutanten von *P. fluorescens* Bk3 hatten in LB und M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp gezeigt. Zwar waren einige der Mutanten (#8-15, #8-28, #13-17 in LB, #13-17 in M9-Medium) etwas verlangsamt angewachsen, trotzdem erreichten sowohl Wildtyp als auch Mutanten nach 48 Stunden eine OD₆₀₀ von etwa 2,4 in LB-Medium und 1,9 in M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin.

Mutante #16-22 war in beiden Medien deutlich langsamer angewachsen und erreichte in LB-Medium nach 48 Stunden nur eine OD₆₀₀ von 1,9. In LB-Medium haben sich sowohl Wildtyp als auch Mutanten nach 48 Stunden in der stationären Phase befunden. Gleiches konnte für M9-Medium gezeigt werden, wobei sich Mutante #16-22 nach 48 Stunden noch in der exponentiellen Wachstumsphase befunden hat (Abb. 3.4.3.1 und 3.4.3.2).

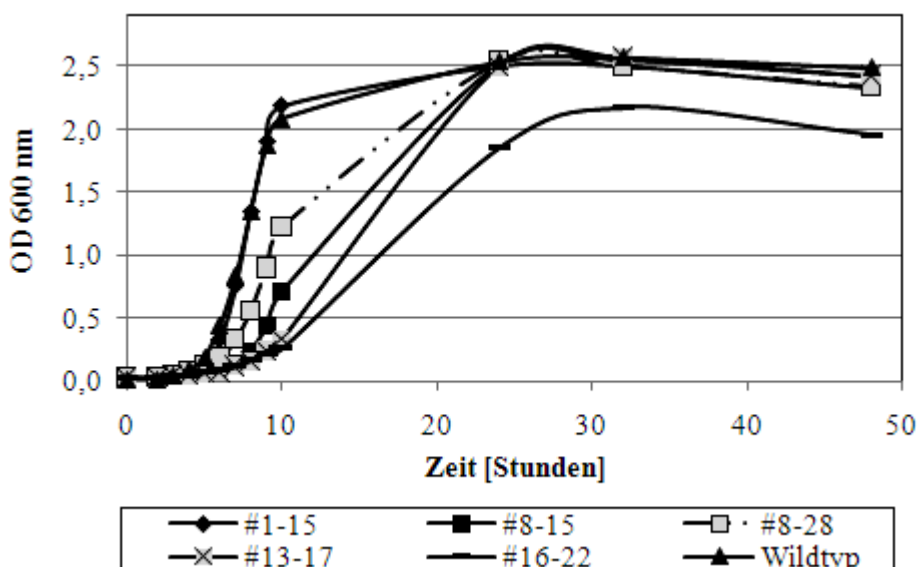


Abb. 3.4.3.1 Wachstumskurven von *P. fluorescens* Bk3, Wildtyp (Wildtyp) und Mutanten (#1-15, #8-15, #8-28, #13-17, #16-22, in LB-Medium.

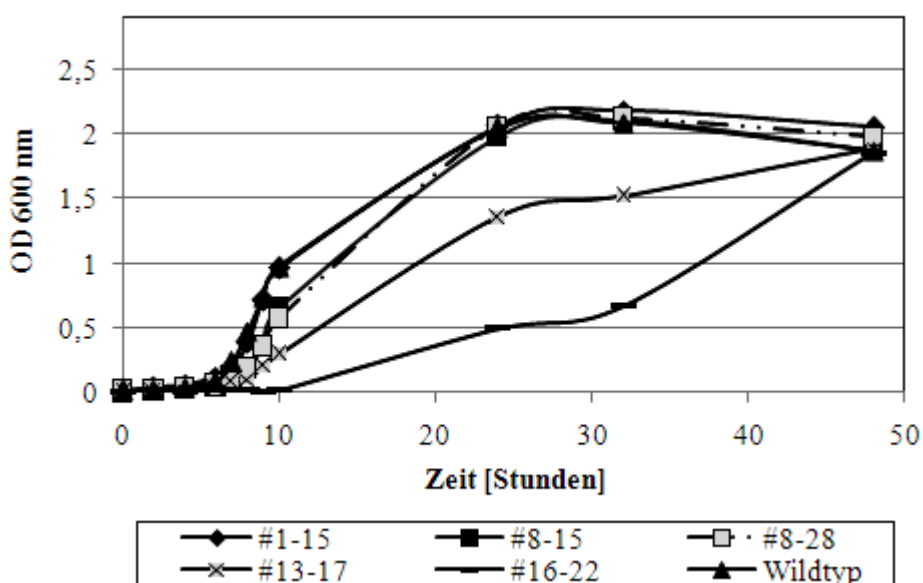


Abb. 3.4.3.2 Wachstumskurven von *P. fluorescens* Bk3, Wildtyp (Wildtyp) und Mutanten (#1-15, #8-15, #8-28, #13-17, #16-22, in M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin.

Wie zuvor bereits aufgeführt, enthält M9-Medium ohne weitere Supplementierung nur Ammonium als anorganische Stickstoffquelle. Sowohl Wildtyp als auch Mutanten von *P. fluorescens* Bk3 konnten aber bei Zusatz von 10 mM Asparagin dieses als alleinige Kohlen- und organische Stickstoffquelle nutzen.

Wildtyp und Mutanten (ausgenommen #16-22) erreichten nach 24 Stunden die stationäre Phase bei einer OD₆₀₀ von 0,65 und gingen nach ca. 40 Stunden in die Absterbephase über. Die Mutanten #8-28 und #13-17 wuchsen dabei etwas langsamer an. #16-22 befand sich erst

nach ca. 28 Stunden in der exponentiellen Wachstumsphase und erreichte auch nach 48 Stunden noch nicht die stationäre Phase (Abb. 3.4.3.3).

Vergleichbar damit waren die Ergebnisse der Wachstumskurven in M9-Medium mit 0,5% Glukose als Kohlenstoffquelle und Nitrat als zusätzliche anorganische Stickstoffquelle. Auch hier wurde nach 24 Stunden die stationäre Wachstumsphase erreicht, allerdings konnte auch nach 48 Stunden noch kein Absterben der Bakterien beobachtet werden. Die Bakterien erreichten eine OD_{600} von etwa 1,5, wobei auch hier Mutante #13-17 deutlich langsamer anwuchs. Mutante #16-22 befand sich nach 48 Stunden noch in der exponentiellen Phase und erreichte nur eine OD_{600} von ca. 0,7 (Abb. 3.4.3.4).

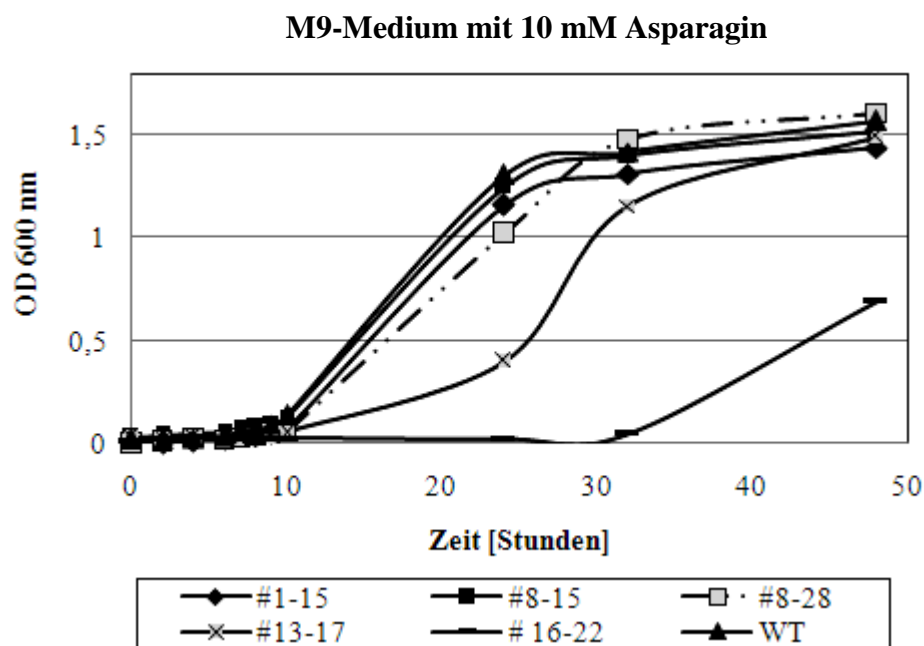


Abb. 3.4.3.3 Wachstumskurven von *P. fluorescens* Bk3, Wildtyp (WT) und Mutanten (#1-15, #8-15, #8-28, #13-17, #16-22, in M9-Medium mit 10 mM Asparagin.

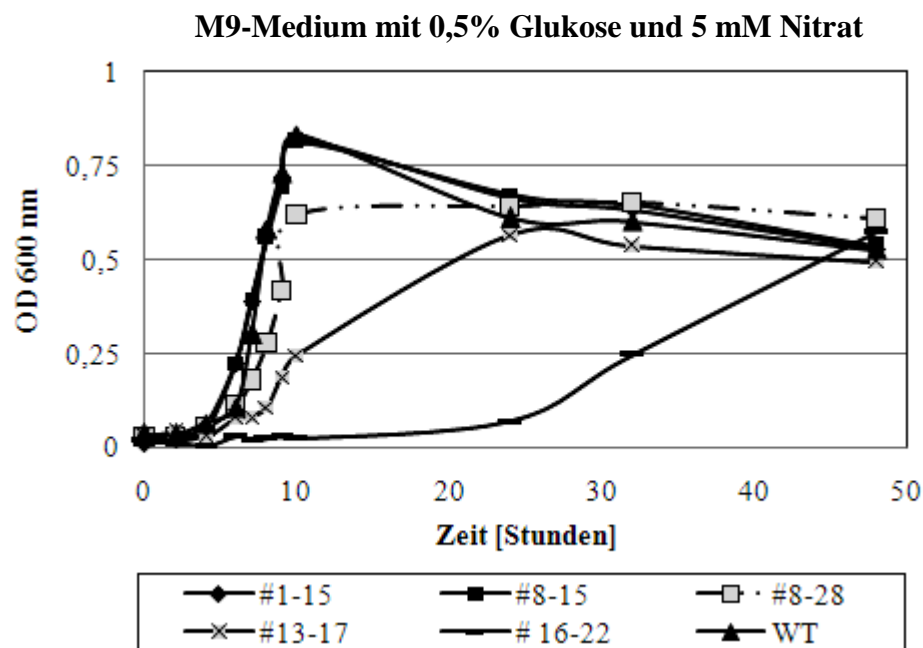


Abb. 3.4.3.4 Wachstumskurven von *P. fluorescens* Bk3, Wildtyp (WT) und Mutanten (#1-15, #8-15, #8-28, #13-17, #16-22, in M9-Medium mit 0,5% Glukose und 5 mM Nitrat.

3.4.4 Wachstumskurven von lumineszenten und nicht-lumineszenten *E. amylovora* 222 in Gegenwart von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit gleichzeitiger Biolumineszenzmessung

Neben der Aufnahme von Wachstumskurven von Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE sind parallele Messungen durchgeführt worden, in der zu gleichen Zeitpunkten die optische Dichte von Zellkulturen bei 600 nm, sowie die Biolumineszenz in jeweils 50 µl der Kulturen mit dem Bioluminometer bestimmt wurde. Wildtyp und biolumineszente Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *E. amylovora* 222 sind hierbei gemeinsam bei einer jeweiligen Start-Zellzahl von 2×10^9 Zellen kultiviert worden. Zur Messung der Biolumineszenz von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3::TngfpluxAB wurden vor der Messung 5 µl 2% Decanal (in 96% Ethanol) zu den Ansätzen gegeben.

Folgende Versuchsansätze sind angesetzt worden:

1. *E. amylovora* 222 in Gegenwart von *P. fluorescens* A506::TngfpluxAB
2. *E. amylovora* 222 in Gegenwart von *P. fluorescens* Bk3::TngfpluxAB
3. *E. amylovora* 222
4. *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart von *P. fluorescens* A506
5. *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart von *P. fluorescens* Bk3
6. *E. amylovora* 222::TnluxCDABE
7. *P. fluorescens* A506
8. *P. fluorescens* A506::TngfpluxAB

9. *P. fluorescens* Bk3
10. *P. fluorescens* Bk3::TngfpluxAB

Die Wachstumskurven vom Wildtyp und den biolumineszenten TngfpluxAB-Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie vom Wildtyp und der autolumineszenten TnluxCDABE-Mutante von *E. amylovora* 222 bestätigten die Ergebnisse aus 3.4.1. Die untersuchten *P. fluorescens*-Stämme wuchsen in LB-Medium schneller an als *E. amylovora* 222 und erreichten eine deutlich höhere optische Dichte ($OD_{600} = 2,8$ nach 24 Stunden) als der biolumineszente Feuerbranderreger ($OD_{600} = 2,1$ nach 24 Stunden).

Co-Kulturen von *E. amylovora* 222 mit *P. fluorescens* A506::gfpTnluxAB und *P. fluorescens* Bk3::TngfpluxAB bzw. Co-Kulturen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit den Wildtypen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zeigten hingegen ein Wachstumsverhalten, dass mit den Einzelkulturen von Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 vergleichbar war (Abb. 3.4.4.1 und 3.4.4.2).

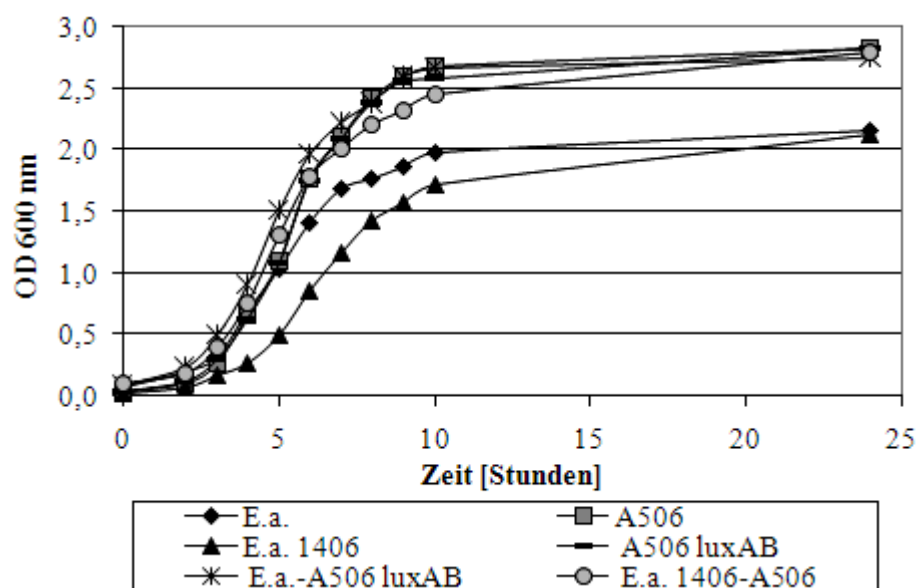


Abb. 3.4.4.1 Wachstumskurven von *E. amylovora* 222 (E.a.) und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a. 1406) in An- und Abwesenheit von *P. fluorescens* A506 (A506) bzw. *P. fluorescens* A506::TngfpluxAB (A506 luxAB). Das LB-Medium wurde mit jeweils 2×10^9 Zellen der einzelnen Bakterienstämme angeimpft.

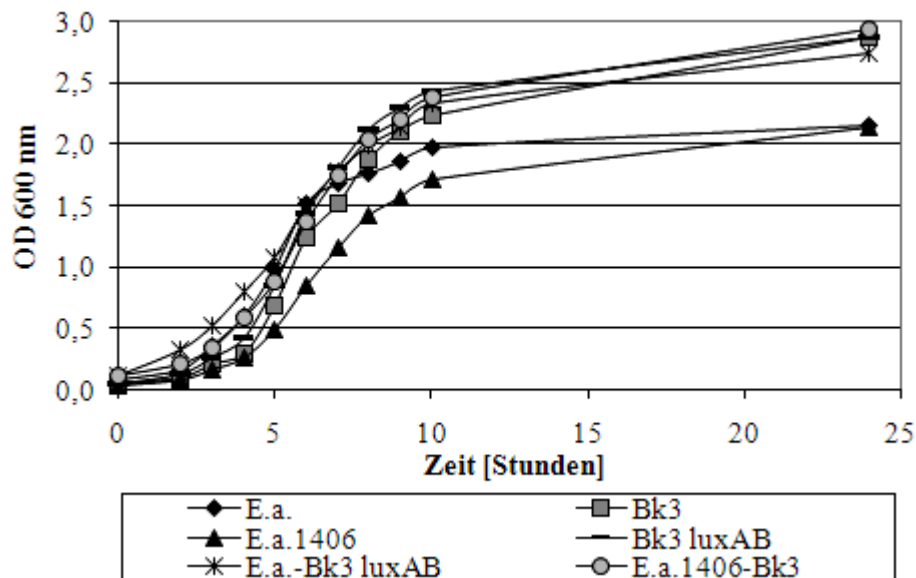


Abb. 3.4.4.2 Wachstumskurven von *E. amylovora* 222 (E.a.) und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a. 1406) in An- und Abwesenheit von *P. fluorescens* Bk3 (Bk3) bzw. *P. fluorescens* Bk3::TngfpluxAB (Bk3 luxAB). Das LB-Medium wurde mit jeweils 2×10^9 Zellen der einzelnen Bakterienstämme angeimpft.

Wurden *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3::TngfpluxAB ohne *E. amylovora* 222 kultiviert, so konnte innerhalb der ersten zehn Stunden eine Zunahme der Biolumineszenz von ca. 1×10^4 auf 1×10^6 RLUs zusammen mit einer Zunahme der Zelldichte beobachtet werden. Nach 24 Stunden nahm die Biolumineszenz auf ca. 1×10^5 (A506) bzw. 5×10^4 (Bk3) ab, was auf eine Reduktion der Nährstoffe im Kulturmedium zurückzuführen sein könnte.

In Gegenwart des Wildtyps *E. amylovora* 222 war die Zunahme der Biolumineszenz bei *P. fluorescens* Bk3::TngfpluxAB vergleichbar mit den oben aufgeführten Ergebnissen, bei *P. fluorescens* A506::TngfpluxAB erfolgte der Anstieg der Biolumineszenz hingegen verzögert und sie erreichte nach zehn Stunden knapp 1×10^5 RLUs.

Wurde *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ohne *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 kultiviert, so konnte trotz des leichten Anstiegs der optischen Dichte innerhalb der ersten fünf Stunden zunächst eine leichte Abnahme der Biolumineszenz von ca. 2×10^4 auf 1×10^4 RLUs beobachtet werden, anschließend einen Anstieg auf 1×10^5 RLUs bis Stunde zehn. Nach 24 Stunden lag die Biolumineszenz knapp unterhalb des Ausgangswertes, was ebenfalls möglicherweise auf eine Reduktion der Nährstoffe im Kulturmedium zurückzuführen sein könnte.

In Gegenwart von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte bis Stunde fünf (A506) bzw. Stunde drei (Bk3) eine zur Einzelkultur vergleichbare Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE gemessen werden, danach fiel diese aber auf einen Wert von 1×10^3 RLUs (A506) bzw. 1×10^2 RLUs (Bk3) ab. Zu dieser Zeit verlief die Zunahme der optischen Dichte bei Einzelkulturen von *P. fluorescens* A506 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE noch parallel, bei *P. fluorescens* Bk3 war nach fünf Stunden hingegen die OD₆₀₀ um ca. 0,3 höher als bei *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Nach 24 Stunden konnte keine Biolumineszenz mehr detektiert werden.

Die nicht-biolumineszenten Stämme *E. amylovora* 222 und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zeigten wie erwartet bei 10-sekündiger Messung keine Biolumineszenz (RLUs = 1×10^1 – 1×10^2) (Abb. 3.4.4.3 und 3.4.4.4).

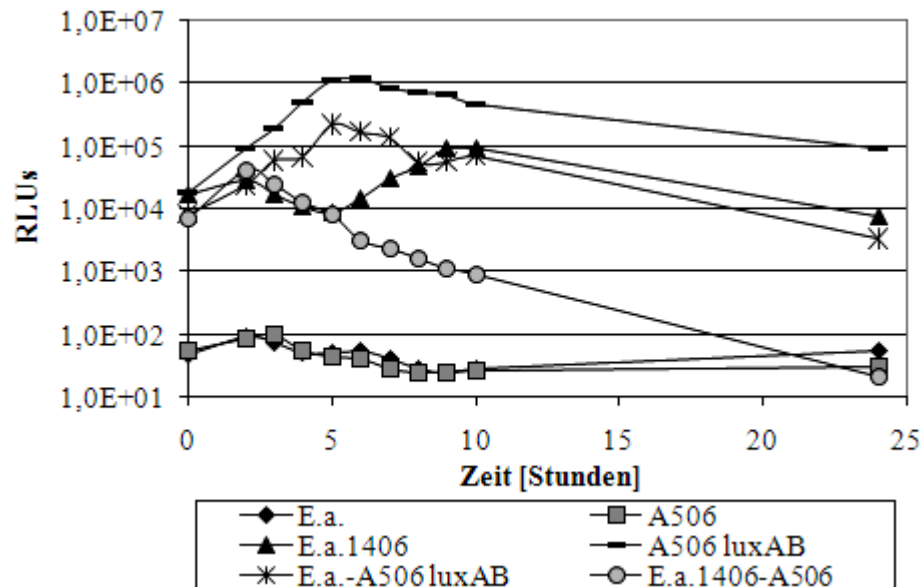


Abb. 3.4.4.3 Im zeitlichen Verlauf gemessene Biolumineszenz von *E. amylovora* 222[::TnluxCDABE] (*E. a.*[1406]) und *P. fluorescens* A506[::TngfpluxAB] (A506[luxAB]); Stämme alleine oder in Co-Kultur kultiviert. Das LB-Medium wurde mit jeweils 2×10^9 Zellen der einzelnen Bakterienstämme angeimpft. Die Biolumineszenz wurde in 50 μ l Zellsuspension mit dem Bioluminometer gemessen, die Belichtungszeit betrug 30 Sekunden. Bei den Ansätzen mit dem Stamm *P. fluorescens* A506[::TngfpluxAB] wurden vor der Messung 5 μ l 2% Decanal (in 96% Ethanol) zugegeben.

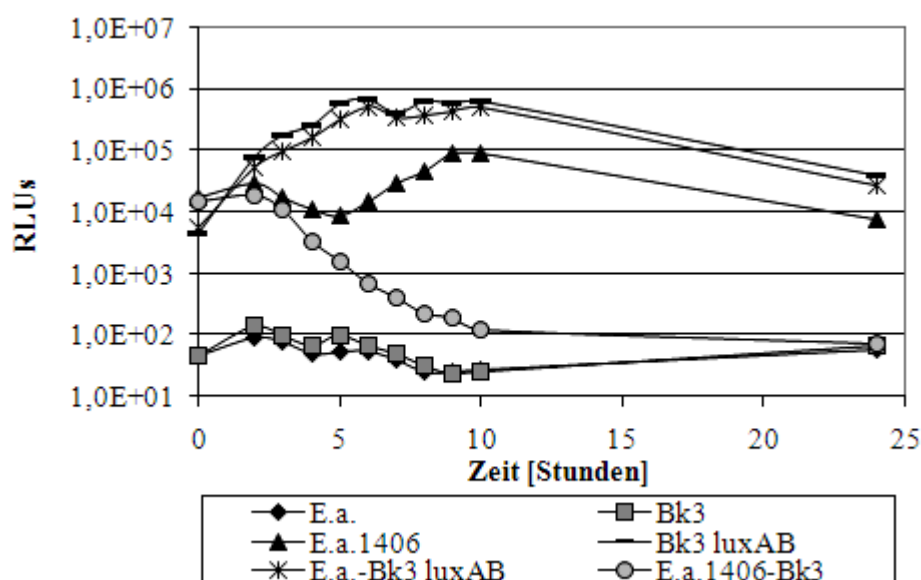


Abb. 3.4.4.4 Im zeitlichen Verlauf gemessene Biolumineszenz von *E. amylovora* 222[::TnluxCDABE] (*E. a.*[1406]) und *P. fluorescens* Bk3[::TngfpluxAB] (Bk3[luxAB]); Stämme alleine oder in Co-Kultur kultiviert. Das LB-Medium wurde mit jeweils 2×10^9 Zellen der einzelnen Bakterienstämme angeimpft. Die Biolumineszenz wurde in 50 μ l Zellsuspension mit dem Bioluminometer gemessen, die Belichtungszeit betrug 30 Sekunden. Bei den Ansätzen mit dem Stamm *P. fluorescens* Bk3[::TngfpluxAB] wurden vor der Messung 5 μ l 2% Decanal (in 96% Ethanol) zugegeben.

3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration in Wachstumsüberständen und Periplasma mit dem Bradford Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der hoch- und niedermolekulare Fraktion von Wachstumsüberständen, die durch Anzucht der Mikroorganismen in verschiedenen Kulturmedien gewonnen worden waren, sowie im Periplasma von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, erfolgte mittels Bradford Assay.

Die Herstellung der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 sowie *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ist unter 2.18 beschrieben worden, die Isolierung des Periplasmas von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 unter 2.19.

Zunächst wurde eine Standardreihe mit BSA (0-25 µg Protein) erstellt (Abb. 3.5.1).

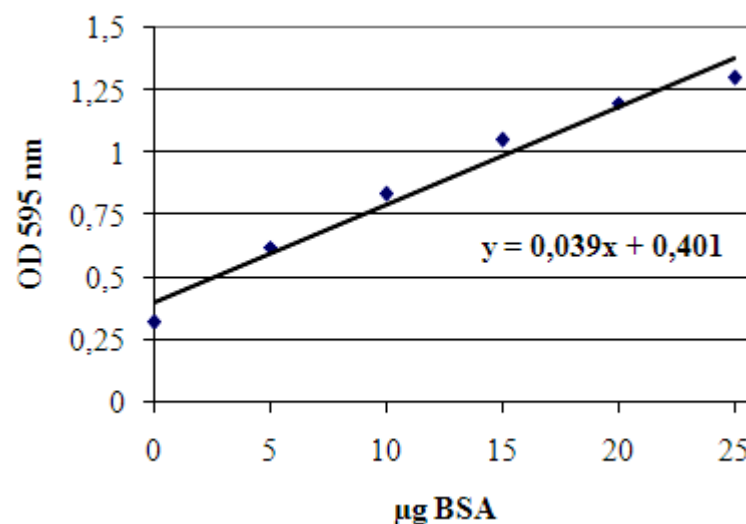


Abb. 3.5.1 Standardreihe für die Proteinbestimmung nach Bradford mit BSA. Die Formel, die zur Berechnung der Proteinkonzentration in den einzelnen Proben dient, ist im Diagramm dargestellt.

Aus der Formel für die Steigung der Standardreihe und der ermittelten OD₅₉₅ der einzelnen Proben von Wachstumsüberständen und Periplasma aus dem Bradfordtest konnte die Proteinkonzentrationen in den Proben berechnet werden (Tabelle 3.5.1).

Tab. 3.5.1 Ermittelte Proteinkonzentrationen in der hoch (> 5 kDa)- und niedermolekularen (< 5 kDa) Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (Wildtyp und Mutanten), *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bzw. in der hoch (> 5 kDa)- und niedermolekularen (< 5 kDa) Fraktion des Periplasmas von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford Assay. Zur Generierung von Wachstumsüberständen erfolgte die Anzucht der Bakterien für 3 Tage in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5 % Glukose (bzw. 2% Glukose für *A. pullulans* CF10 und CF40) und 0,5 mM CaCl₂ (für *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auch ohne CaCl₂). Zur Isolierung des Periplasmas wurden die Bakterien in LB-Medium über Nacht angezogen. Je 50 ml Wachstumsüberstände und ca. 12 ml Periplasma wurden über einen Ankonzentrator in ca. 150 µl einer ankonzentrierten, hochmolekularen Fraktion (> 5 kDa) und eine nicht ankonzentrierte, niedermolekulare Fraktion (< 5 kDa) unterteilt. Für den Assay wurden jeweils 5 µl der Proben eingesetzt. n.d.= kein Nachweis von Proteinen in der Probe.

| | Wachstumsüberstand > 5 kDa | Wachstumsüberstand < 5 kDa |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|
| | Ermittelte Proteinkonzentration [µg/µl] | |
| <i>P. fluorescens</i> A506 | M9-Medium | |
| Wildtyp | 1-2 | n.d. |
| <i>P. fluorescens</i> A506 | M9-Medium mit 0,5 mM CaCl₂ | |
| Wildtyp | 5-8 | n.d. |
| Mutante #8-42 | n.d. | n.d. |
| Mutante #19-56 | 5-6 | n.d. |
| Mutante #29-60 | 3-5 | n.d. |
| Mutante #37-54 | 6-7 | n.d. |
| Mutante #39-55 | 4-5 | n.d. |
| Mutante #96-6-175 | 5-7 | n.d. |
| | Ermittelte Proteinkonzentration [µg/µl] | |
| <i>P. fluorescens</i> Bk3 | M9-Medium | |
| Wildtyp | 1-1,5 | n.d. |
| <i>P. fluorescens</i> Bk3 | M9-Medium mit 0,5 mM CaCl₂ | |
| Wildtyp | 4-8 | n.d. |
| Mutante #1-15 | 3-5 | n.d. |
| Mutante #8-15 | 4-5 | n.d. |
| Mutante #8-28 | 5-8 | n.d. |
| Mutante #13-17 | 3-4 | n.d. |
| Mutante #16-22 | 3-4 | n.d. |
| | Ermittelte Proteinkonzentration [µg/µl] | |
| <i>A. pullulans</i> | M9-Medium mit 0,5 mM CaCl₂ | |
| Wildtyp CF10 | 1,8-2,5 | n.d. |
| Wildtyp CF40 | 0,5-1,0 | n.d. |
| <i>E. amylovora</i> | M9-Medium mit oder ohne 0,5 mM CaCl₂ | |
| ::TnluxCDABE | n.d. | n.d. |

| | Periplasma > 5 kDa | Periplasma < 5 kDa |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|
| | Ermittelte Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] | |
| <i>P. fluorescens</i> | | |
| Wildtyp A506 | 12-18 | n.d. |
| Wildtyp Bk3 | 10-18 | n.d. |

3.6 Charakterisierung von Wachstumsüberständen und Periplasma von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (Wildtyp und Mutanten) und Wachstumsüberständen von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 sowie von *E. amylovora* 222 mittels 1D und 2D Gelelektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die hochmolekulare Fraktion von Wachstumsüberständen des Feuerbranderreger *E. amylovora* 222 sowie der gewählten Antagonisten mit 1D und 2D-Gelelektrophorese näher charakterisiert. Die Anzucht der Bakterien und Hefen erfolgte jeweils für drei Tage in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose (bzw. 2% Glukose für die *A. pullulans*-Stämme) und optional 0,5 mM CaCl_2 .

Zum einen konnte somit die extrazelluläre Proteinzusammensetzung von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, *E. amylovora* 222 sowie *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 dargestellt werden, zum anderen Unterschiede von Wildtyp und den in dieser Arbeit hergestellten Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 aufgezeigt werden.

Zusätzlich zur Analyse der Wachstumsüberstände erfolgte eine Gelelektrophore mit dem Periplasma von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3.

3.6.1 1D-Gelelektrophorese der Wachstumsüberstände und des Periplasmas von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie der Wachstumsüberstände von *A. pullulans* CF10 und CF40

Abbildung 3.6.1.1 zeigt die ankonzentrierte hochmolekulare Fraktion ($> 5 \text{ kDa}$) der Wachstumsüberstände von den Wildtypen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, angezogen in Abwesenheit (A) bzw. in Anwesenheit (B) von 0,5 mM CaCl_2 .

Abbildung 3.6.1.2 zeigt die ankonzentrierte periplasmatische Fraktion von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3.

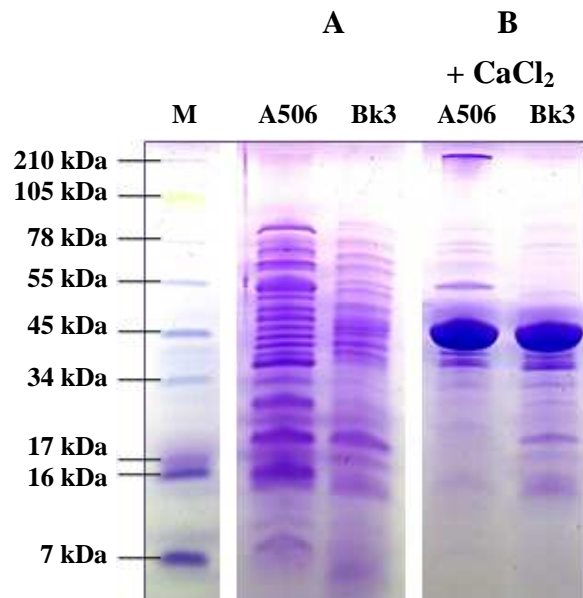


Abb. 3.6.1.1 Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506 bzw. Bk3). **A** Wachstumsüberstände angezogen in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose **B** Wachstumsüberstände angezogen angezogen in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,5 mM CaCl_2 . Auftrag: je 10 μg Gesamtprotein. 9%iges Tris-Tricin-Gel, Coomassie-Färbung M: Marker See Blue Plus2, Invitrogen.

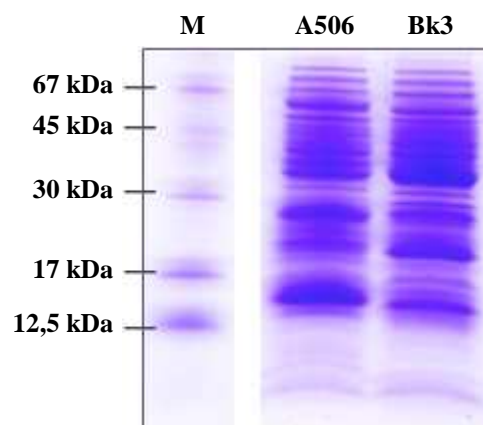


Abb. 3.6.1.2 Periplasma von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506 bzw. Bk3). Auftrag: je 10 μg Gesamtprotein. 9%iges Tris-Tricin-Gel, Coomassie-Färbung. M: Marker.

In den Wachstumsüberständen und auch im Periplasma von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sind zahlreiche Proteine enthalten. Die Proteinzusammensetzung in Wachstumsüberstand und Periplasma scheint dabei zwischen den beiden gewählten bakteriellen Antagonisten sowohl in Zusammensetzung als auch in der Konzentration unterschiedlich zu sein.

Der Wachstumsüberstand von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 beinhaltet Proteine mit apparenten molaren Massen zwischen ca. 85 und 7 kDa. In Gegenwart von 0,5 mM CaCl_2 wurde nachweislich mit Bradford-Proteinbestimmung deutlich mehr Protein in den Wachstumsüberstand von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 abgegeben als ohne Kalziumzugabe (ca. 4-5 x mehr, siehe 3.6); zudem wurde insbesondere ein Protein mit apparter molarer

Masse von ca. 45 kDa besonders stark sekretiert. Auf dem Gel ist diese Bande klar hervorgehoben, während andere Proteine scheinbar schwächer exprimiert worden sind. Allerdings wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein aus den Wachstumsüberständen auf die Proteingele aufgetragen, so dass andere Proteine der Wachstumsüberstände auf Grund des hohen Verhältnisses des 45 kDa Proteins in den Hintergrund traten.

Das Periplasma von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 beinhaltet Proteine mit apparenten molaren Massen > 67 kDa und < 12,5 kDa. Einige Proteinbanden mit apparenten molare Massen von ca. 65, 35, 27, 23 und 15 kDa schienen dabei im Verhältnis zu den anderen Proteinen stärker exprimiert vorzuliegen.

In der niedermolekularen Fraktion (> 5 kDa) der Wachstumsüberstände und des Periplasmas konnten sowohl über eine Tris-Tricin-Gelelektrophorese mit Coomassie- bzw. mit einer sensitiveren Silberfärbung als auch über eine Bradford-Proteinbestimmung (siehe 3.5) keine Proteine detektiert werden (keine Abbildung gezeigt).

Im Wachstumsüberstand von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 konnten im Vergleich zu *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 deutlich weniger prägnante Proteinbanden mit apparenten molaren Massen zwischen ca. 95 und 16 kDa detektiert werden (siehe Abbildung 3.6.1.3). *A. pullulans* CF10 scheint dabei ein vielfältigeres Spektrum als *A. pullulans* CF40 zu sekretieren; hier lagen zusätzlich Proteinbanden mit apparenten molaren Massen von ca. 80, 55, 50, 40, 37, 27 und 25 kDa vor, die bei *A. pullulans* CF40 nicht detektiert wurden. Auch in diesem Fall konnten in der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände weder mit einer Tris-Tricin-Gelelektrophorese mit Coomassie- bzw. der sensitiveren Silberfärbung, noch über eine Bradford-Proteinbestimmung Proteine detektiert werden (keine Abbildung gezeigt).

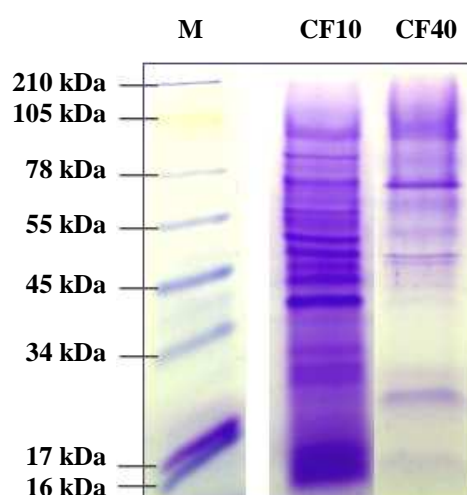


Abb. 3.6.1.3 Wachstumsüberstände von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 (CF10 und CF40). Die Anzucht der Hefen erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 2% Glukose und 0,5 mM CaCl₂. Auftrag: je 10 µg Gesamtprotein. 9%iges Tris-Tricin-Gel, Coomassie-Färbung. M: Marker See Blue Plus2, Invitrogen.

3.6.2 Charakterisierung der Wachstumsüberstände von Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 durch 2D-Gelelektrophorese

Von Wachstumsüberständen (> 5 kDa) des Wildtyps und der Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 wurden 2D-Gele erstellt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte für drei Tage in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,5 mM CaCl_2 . Nach Ankonzentration der Wachstumsüberstände wurden 150 μg Gesamtprotein in 20 μl für die isoelektrische Fokussierung verwendet.

Mutante *P. fluorescens* A506 #8-42 konnte in M9-Medium nicht wachsen; hier wurde eine Anzucht für drei Tage in LB-Medium mit 0,5 mM CaCl_2 vorgenommen und der Wachstumsüberstand anschließend durch Dialyse gegen 40% PEG 4000 ankonzentriert. Auch hier wurden 150 μg Gesamtprotein in 20 μl für die isoelektrische Fokussierung verwendet.

Mittels der 2D-Gele der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 ist es möglich gewesen, die einzelnen Proteine verbessert voneinander abzutrennen, als es mit einem eindimensionalen Gel möglich gewesen ist. Wie auch schon aus den eindimensionalen Gelen ersichtlich wurde (siehe 3.6.1), waren auch hier Unterschiede in der Zusammensetzung und Konzentration der Proteine bei *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zu erkennen (Abb. 3.6.2.1). Ebenfalls konnten Proteine mit apparenten molaren Massen zwischen 85 und 7 kDa gezeigt werden; die meisten Proteine lagen im pH-Bereich zwischen pH 4 und pH 8.

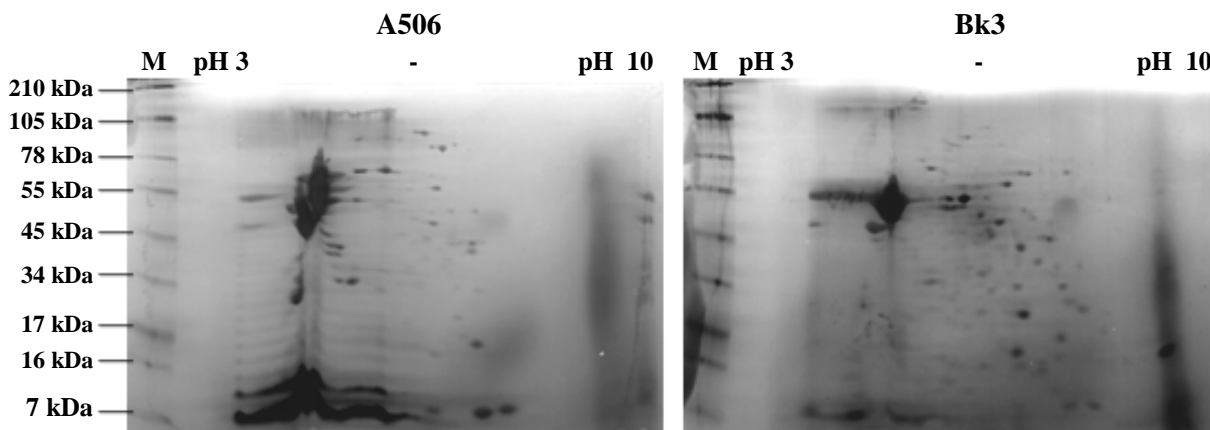


Abb. 3.6.2.1 2D-Gele der Wachstumsüberstände des Wildtyps von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506 bzw. Bk3). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,5 mM CaCl_2 . Auftrag: je 150 μg Gesamtprotein. Der verwendete IEF-Streifen hatte einen pH-Range von pH 3-10, für die 2. Dimension wurde ein 9%iges Tris-Tricin-Gel verwendet. Die Gele wurden Silber-gefärbt. M: Marker See Blue.

In den in Abb. 3.6.2.3 gezeigten 2D-Gelen der Wachstumsüberstände der *P. fluorescens* A506-Mutanten fehlten im Vergleich zum Wildtyp verschiedene Proteinspots bzw. lagen in einer geringeren Konzentration vor (markiert durch schwarze Umkästelung). Verändert sekretierte Proteine wurden in Tabelle 3.6.2.1 zur Übersicht noch einmal ergänzend aufgeführt.

Der Wachstumsüberstand der Mutante *P. fluorescens* A506 #8-42, die in LB-Medium angezogen worden ist, beinhaltete nach der Bradford-Proteinbestimmung nur ein Drittel der Proteinmenge, die für den Wachstumsüberstand des Wildtyps von *P. fluorescens* A506 festgestellt werden konnte (siehe 3.5). Dies zeigte sich auch in den 2D-Gelen. Einzelne Proteinspots auf den 2D-Gelen waren zwar nicht sauber voneinander getrennt, was durch die Vorbehandlung der Proben (Ankonzentration mit PEG 4000) bedingt gewesen sein könnte. Es war aber deutlich zu erkennen, dass der Wachstumsüberstand des Wildtyps von *P. fluorescens* A506 ein Spektrum von Proteinen aufweist (erkennbar am Schmier auf dem Gel, markiert durch schwarze Kästchen), das bei der Mutante #8-42 nahezu vollständig fehlt (siehe Abb. 3.6.2.2).

Mutante #8-42 ist demnach im Vergleich zum Wildtyp nicht nur unfähig in einem Minimalmedium anzuwachsen (siehe 3.4.2), sondern sekretiert auch eine deutlich veränderte Proteinzusammensetzung.

Ähnlich wie im Vergleich von Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* A506 bestanden auch deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung extrazellulärer Proteine der Wachstumsüberstände von Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* Bk3.

In den in Abb. 3.6.2.4 gezeigten 2D-Gelen der Wachstumsüberstände fehlten verschiedene Proteinspots bzw. lagen in einer geringeren Konzentration vor (markiert durch schwarze Umkästelung), allerdings schienen auch einige Spots stärker im Vergleich zum Wildtyp vorzuliegen (weiße Umkästelung). Mutante *P. fluorescens* Bk3 #8-15 und #16-22 zeigten eine starke Einschränkung in der Zusammensetzung ihrer extrazellulären Proteine; die Gele wiesen nur wenige deutliche Spots auf. Aus diesem Grund wurde für diese beiden Gele auf eine Markierung fehlender Spots verzichtet.

Alle verändert sekretierte Proteine wurden in Tabelle 3.6.2.1 zur Übersicht noch einmal ergänzend aufgeführt.

Ob die fehlenden oder schwächer bzw. anders exprimierten Proteine der Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 letztlich mit der herabgesetzten inhibitorischen Wirksamkeit der Mutanten gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zusammenhängen, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden; die Sequenzierung der Mutanten ergab Integrationsorte der Mutationen, bei denen keine Gene speziell für extrazelluläre Proteine oder andere extrazelluläre Moleküle betroffen waren (siehe 3.3.3). Hierfür bedürfte es einer Sequenzierung und Identifizierung der Proteinspots. Zudem ist durch die verwendete Silberfärbung nicht sicher gestellt, dass es sich bei den Spots auch tatsächlich um Proteine handelt, da mit dieser Färbemethode auch Nukleinsäuren, Lipide, Lipopolysaccharide und Glykolipide angefärbt werden.

Tab. 3.6.2.1 Überblick über stärker bzw. schwächer exprimierte Proteine der Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 im Verhältnis zum jeweiligen Wildtyp. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium mit 0,5 mM CaCl_2 (*P. fluorescens* A506 #8-42) bzw. M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 2% Glukose und 0,5 mM CaCl_2 (alle übrigen Mutanten). Die Proteine wurden mit 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. (Auftrag: je 150 μg Gesamtprotein. 1. Dimension: IPG-Streifen mit pH-Range von pH 3-10, 2. Dimension: 9 %iges Tris-Tricin-Gel). Die Tabelle führt die apparenten molaren Massen sowie den geschätzten pH-Bereich, in dem die Proteine liegen, auf.

| <i>P. fluorescens</i> A506 | | |
|----------------------------|---------------------------------|-----|
| | schwächer exprimiert/fehlend | |
| Mutante | Proteinbereich [kDa] | pI |
| #8-42 | Zahlreiche Proteine fehlend | |
| #19-56 | 40 | 6-7 |
| | 50 | 9 |
| | 55-80 | 6-7 |
| #29-60 | 40 | 4 |
| | 55-80 | 6-7 |
| #37-54 | 55-80 | 6-7 |
| #39-55 | 40 | 4 |
| #96-6-175 | 40 | 4 |
| | 50 | 50 |

| <i>P. fluorescens</i> Bk3 | | | | |
|---------------------------|--------------------------------------------------------|-----|-------------------------|----|
| | schwächer exprimiert/fehlend | | stärker exprimiert | |
| Mutante | Proteinbereich [kDa] | pI | Proteinbereich [kDa] | pI |
| #1-15 | Proteine nicht klar dargestellt, zahlreiche fehlend | | | |
| #8-15 | 17-34 | 6-7 | | |
| #8-28 | 17 | 6-7 | 50 | 9 |
| #13-17 | 17-34 | 6-7 | 17 | 4 |
| | | | 65 | 9 |
| #16-22 | Proteine nicht klar dargestellt, zahlreiche fehlend | | | |

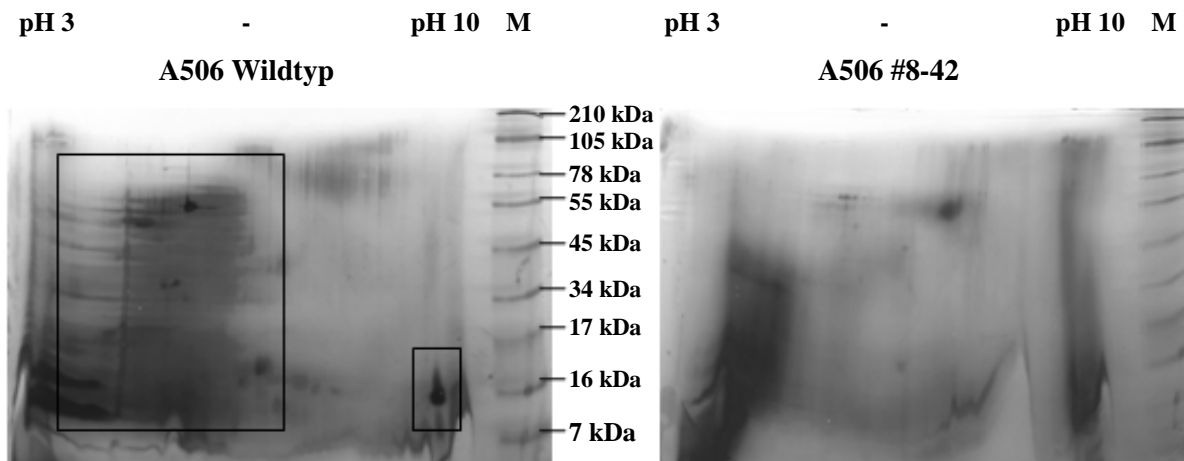


Abb. 3.6.2.2 2D-Gele der Wachstumsüberstände des Wildtyps (A506 Wildtyp) und der Mutante #8-42 von *P. fluorescens* A506 (A506 #8-42). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium mit 0,5 mM CaCl_2 . Auftrag: je 150 μg Gesamtprotein. Der verwendete IPG-Streifen hatte einen pH-Range von pH 3-10, für die 2. Dimension wurde ein 9%iges Tris-Tricin-Gel verwendet. Gele wurden Silber-gefärbt. M: Marker See Blue. Im Vergleich zur Mutante stärker exprimierte Spots/Schmier wurden mittels schwarzer Kästchen markiert.

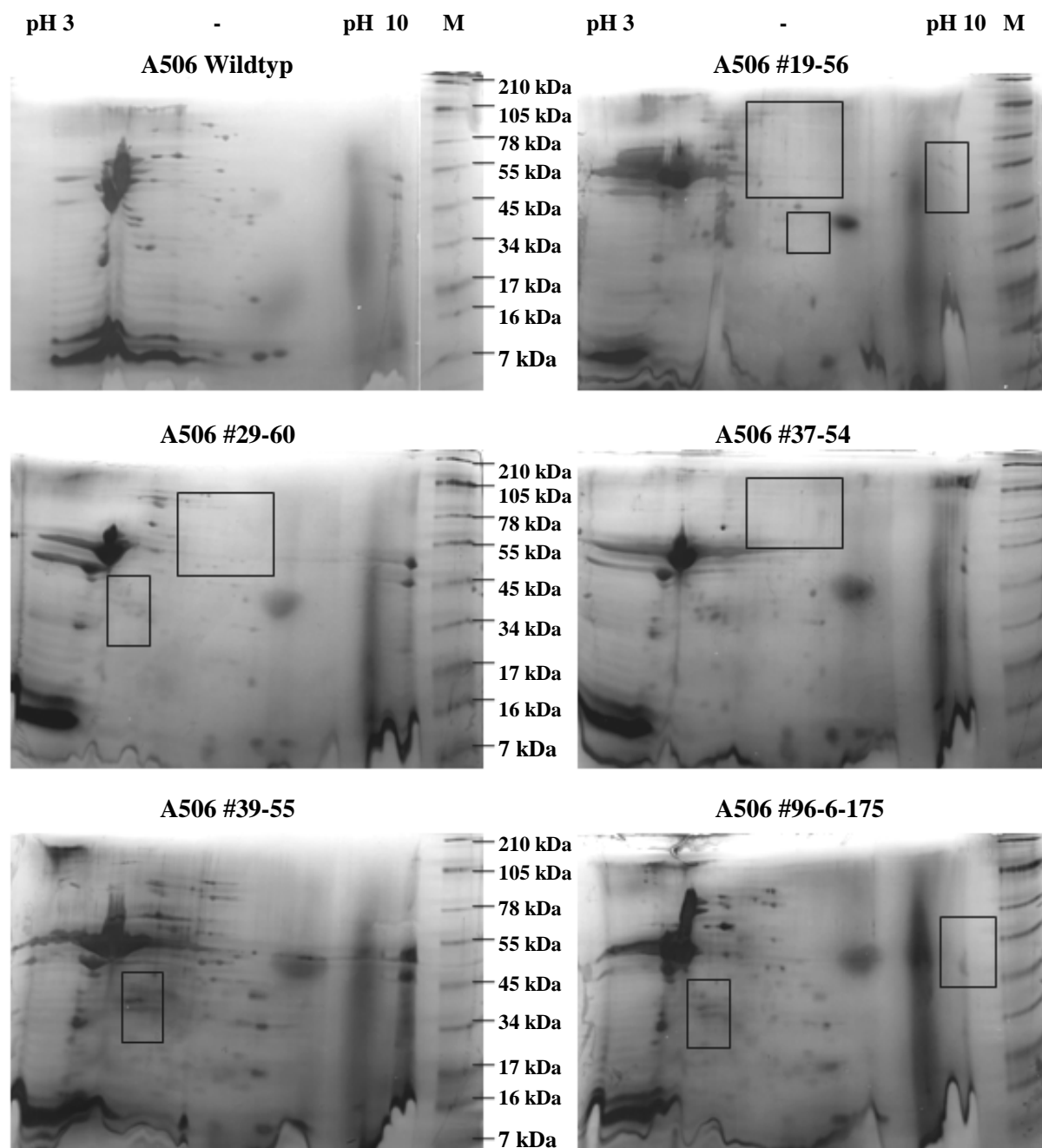


Abb. 3.6.2.3 2D-Gele der Wachstumsüberstände des Wildtyps (A506 Wildtyp) und der Mutanten von *P. fluorescens* A506 (A506 #X). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,5 mM CaCl_2 . Auftrag: je 150 μg Gesamtprotein. Der verwendete IPG-Streifen hatte einen pH-Range von pH 3-10, für die 2. Dimension wurde ein 9%iges Tris-Tricin-Gel verwendet. Gele wurden Silbergefärbt. M: Marker See Blue. Im Vergleich zum Wildtyp schwächer exprimierte oder fehlende Spots wurden mittels eines schwarzen Kästchens markiert.

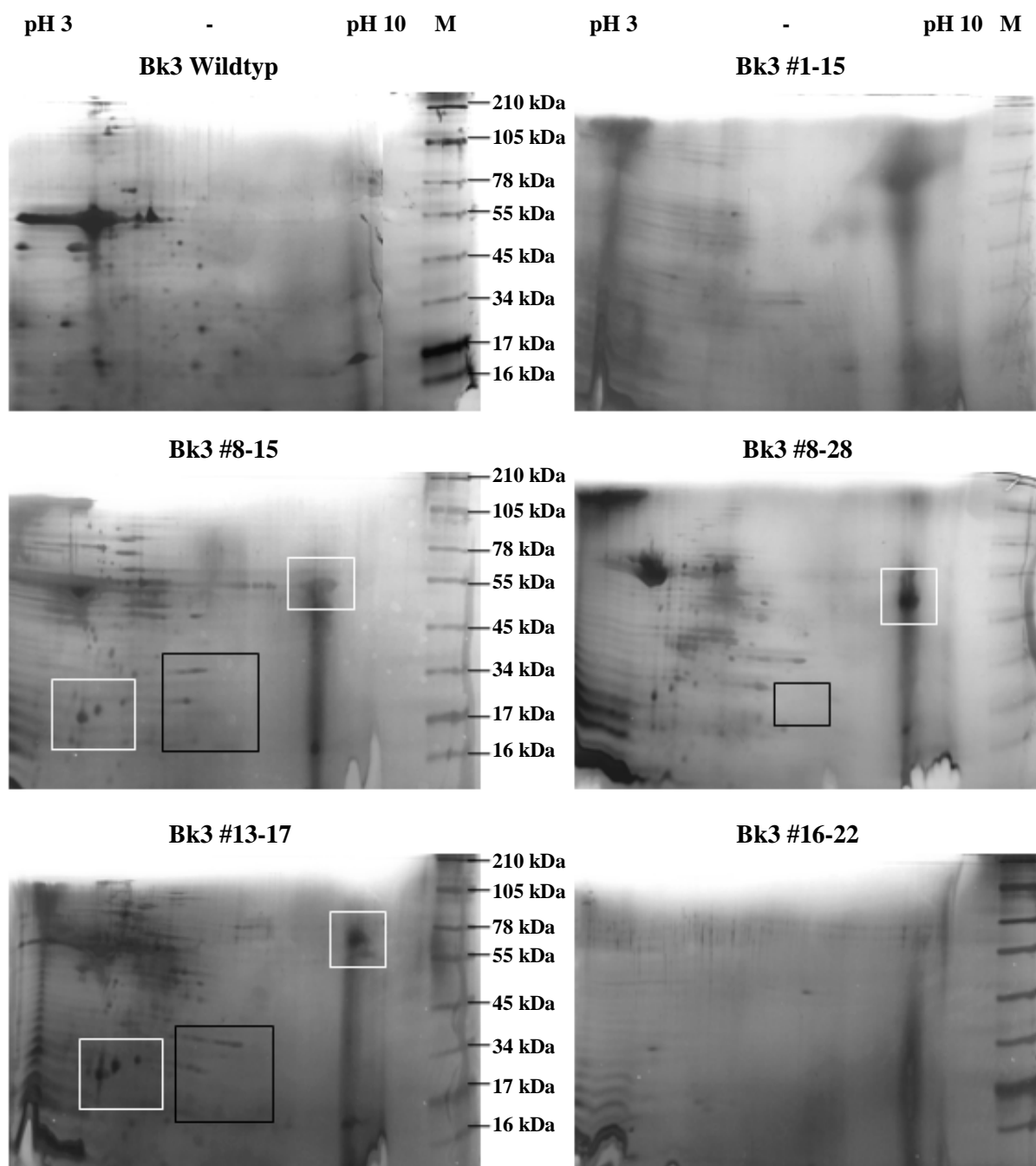


Abb. 3.6.2.4 2D-Gele der Wachstumsüberstände des Wildtyps (Bk3 Wildtyp) und der Mutanten von *P. fluorescens* Bk3 (Bk3 #X). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,5 mM CaCl_2 . Auftrag: je 150 μg Gesamtprotein. Der verwendete IPG-Streifen hatte einen pH-Range von pH 3-10, für die 2. Dimension wurde ein 9%iges Tris-Tricin-Gel verwendet. Gele wurden Silbergefärbt. M: Marker See Blue. Im Vergleich zum Wildtyp schwächer exprimierte oder fehlende Spots wurden mittels eines schwarzen Kästchens markiert, stärker exprimierte mittels eines weißen Kästchens.

3.6.3 Untersuchung des Einflusses von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf die Proteinsekretion von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 durch Analyse der extrazellulären Proteinzusammensetzung mit 2D Gelelektrophorese

Schwerpunkt dieser Untersuchung war die Fragestellung, ob die *P. fluorescens*-Stämme A506 bzw. Bk3 auf die Anwesenheit von *E. amylovora* 222 mit einer veränderten Sekretion von Proteinen reagieren können. *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 wurde für drei Tage in An- und Abwesenheit von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5 % Glukose und optional 0,5 mM CaCl₂ angezogen. Die 2D-Gelelektrophorese erfolgte wie unter 2.21 beschrieben. Es wurden 150 µg Gesamtprotein für die IEF eingesetzt, anschließend eine Tris-Tricin-Gelelektrophorese mit einem 9 %igem Gel und eine Silberfärbung durchgeführt.

Die nachfolgende Abbildung 3.6.3.1 zeigt deutliche Unterschiede im Proteinmuster zwischen Wachstumsüberständen, wo die Antagonisten alleine oder in Co-Kultur mit *E. amylovora* 222 angezogen worden sind. Proteine, die in in Co-Kultur mit *E. amylovora* 222 stärker sekretiert wurden, sind hier durch ein schwarzes Kästchen markiert worden, schwächer exprimierte hingegen durch ein weißes Kästchen.

Wenn *P. fluorescens* A506 in Gegenwart von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE angezogen wurde, konnte im Wachstumsüberstand eine stärkere Sekretion von Proteinen im Bereich von 78, 45, 34 und 16 kDa, sowie eine schwächere von zwei Proteinen in einem Bereich von ca. 7 kDa (Abb. 3.6.3.1, oben rechts). Wachstumsüberstände bei Co-Kultur von *P. fluorescens* Bk3 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zeigten eine stärkere Sekretion von Proteinen im Bereich von etwa 25 und 15 kDa, sowie eine schwächere Sekretion von Proteinen in einem Bereich von ca. 65 und 45 kDa (Abb. 3.6.3.1, mitte rechts).

Stärker oder schwächer exprimierte Spots stimmten nicht mit Spots von Gelen überein, auf die der Wachstumsüberstand von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE aufgetragen worden ist (Abb. 3.6.3.1, unten links), während hingegen verändert sekretierte Proteine häufig auch bei alleiniger Kultur von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 vorlagen. Dennoch kann an dieser Stelle nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die verändert sekretierten Proteine tatsächlich ausschließlich von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 stammen, oder ob es sich um Proteine von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE handelt. Der starke Schmier, der auf dem Gel mit dem Überstand von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zu sehen ist, könnte möglicherweise auf andere extrazelluläre Produkte des Feuerbrandreggers zurückzuführen sein, da eine Silberfärbung nicht nur Proteine, sondern auch Nukleinsäuren, Lipide, Zucker u.a. färbt. Eine Möglichkeit wären extrazelluläre Polysaccharide wie das Amylovoran, das durch *E. amylovora* sekretiert wird.

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Versuchsansätzen wurden noch einmal Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in An- und Abwesenheit von

E. amylovora 222::TnluxCDABE in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5 % Glukose, aber ohne CaCl_2 angezogen worden sind, gewonnen. Die gewählten *Pseudomonaden* produzierten in Gegenwart von CaCl_2 eine deutlich höhere Konzentration extrazellulärer Proteine, so dass dadurch möglicherweise durch den Feuerbranderreger auftretende Effekte auf *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 überdeckt worden sind.

Abbildung 3.6.3.2 zeigt die Wachstumsüberstände der Co-Kulturen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, die ohne CaCl_2 , angezogen worden sind. Deutlich erkennbar ist hier eine Heraufregulation von Proteinen im Bereich zwischen 40 und 78 kDa bei Co-Kultur von *P. fluorescens* A506 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (Abb. 3.6.3.2, oben rechts), sowie eine Heraufregulation von Proteinen mit apparenten molaren Massen von ca. 45, 20, 17 und 16 kDa bei Co-Kultur von *P. fluorescens* Bk3 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (Abb. 3.6.3.2, unten rechts).

Auf 2D-Gelen der Wachstumsüberstände von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, angezogen in M9-Medium ohne CaCl_2 , konnten keine Proteinspots nach Silberfärbung detektiert werden (Abb. 3.6.3.2). Auch wenn nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die verändert sekretierten Proteine tatsächlich ausschließlich von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 stammen, so deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Antagonistenstämme auf die Gegenwart des Feuerbranderregers mit einer veränderten Proteinsekretion reagieren.

Alle in Gegenwart des Feuerbranderregers verändert sekretierten Proteine sind zusammengefasst in Tabelle 3.6.3.1 noch einmal aufgeführt.

Tab. 3.6.3.1 Überblick über stärker bzw. schwächer exprimierte Proteine von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und optional mit 0,5 mM CaCl_2 . Die Proteine wurden mit 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. (Auftrag: je 150 µg Gesamtprotein. 1. Dimension: IPG-Streifen mit einem pH-Range von pH 3-10, 2. Dimension: 9 %iges Tris-Tricin-Gel). Die Tabelle führt die apparenten molaren Massen sowie den geschätzten pH-Bereich, in dem die Proteine liegen, auf.

| <i>P. fluorescens</i> A506 + <i>E. amylovora</i> 222 | | |
|------------------------------------------------------|----------------------|-----|
| M9-Medium | Proteinbereich [kDa] | pI |
| + 0,5 mM CaCl ₂ | stärker exprimiert | |
| | 16 | 6 |
| | 34 | 7 |
| | 45 | 7 |
| | 78 | 7-8 |
| | schwächer exprimiert | |
| 7 | 7-8 | |
| - 0,5 mM CaCl ₂ | stärker exprimiert | |
| | 40-45 | 4-5 |
| | 50-78 | 5-6 |
| | schwächer exprimiert | |
| | --- | --- |

| <i>P. fluorescens</i> Bk3 + <i>E. amylovora</i> 222 | | |
|-----------------------------------------------------|----------------------|-----|
| M9-Medium | Proteinbereich [kDa] | pI |
| + 0,5 mM CaCl ₂ | stärker exprimiert | |
| | 15 | 8 |
| | 16 | 6 |
| | schwächer exprimiert | |
| | 45 | 7 |
| 65 | 6 | |
| - 0,5 mM CaCl ₂ | stärker exprimiert | |
| | 16 | 8 |
| | 17 | 5 |
| | 20 | 8 |
| | 45 | 8 |
| | schwächer exprimiert | |
| | --- | --- |

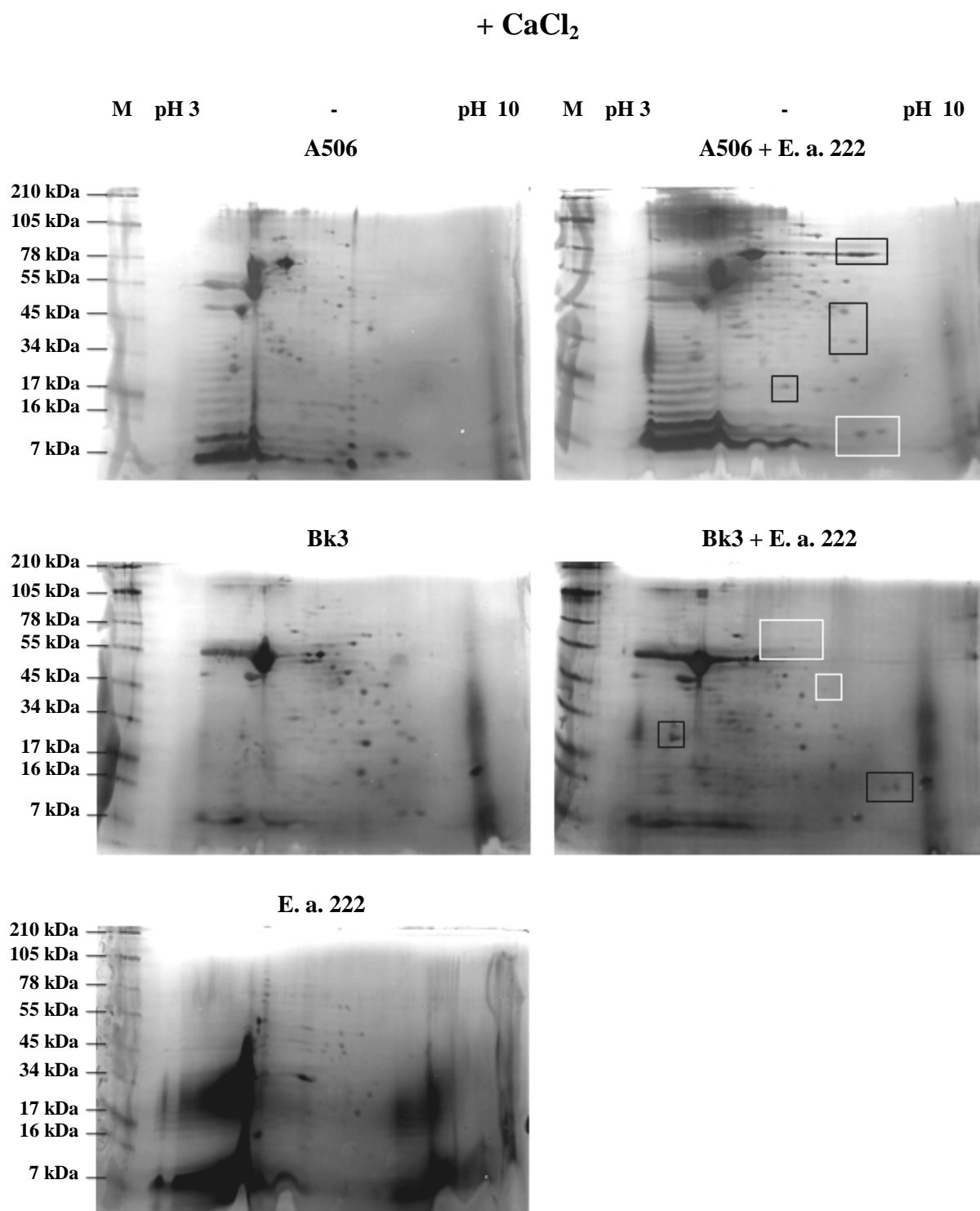


Abb. 3.6.3.1 2D-Gele der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, angezogen in Abwesenheit (A506, Bk3) oder Anwesenheit von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (A506/Bk3 + E. a. 222). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,5 mM CaCl₂. Bei Co-Kultur wurden zum Animpfen des Mediums gleiche Zellzahlen von Pathogen und Antagonist verwendet. Auftrag: je 150 µg Gesamtprotein. Der verwendete IPG-Streifen hatte einen pH-Range von pH 3-10, für die 2. Dimension wurde ein 9%iges Tris-Tricin-Gel verwendet. Gele wurden Silber-gefärbt. M: Marker See Blue. In Gegenwart von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE stärker exprimierte Spots wurden mittels eines schwarzen Kästchens markiert, schwächer exprimierte mittels eines weißen Kästchens.

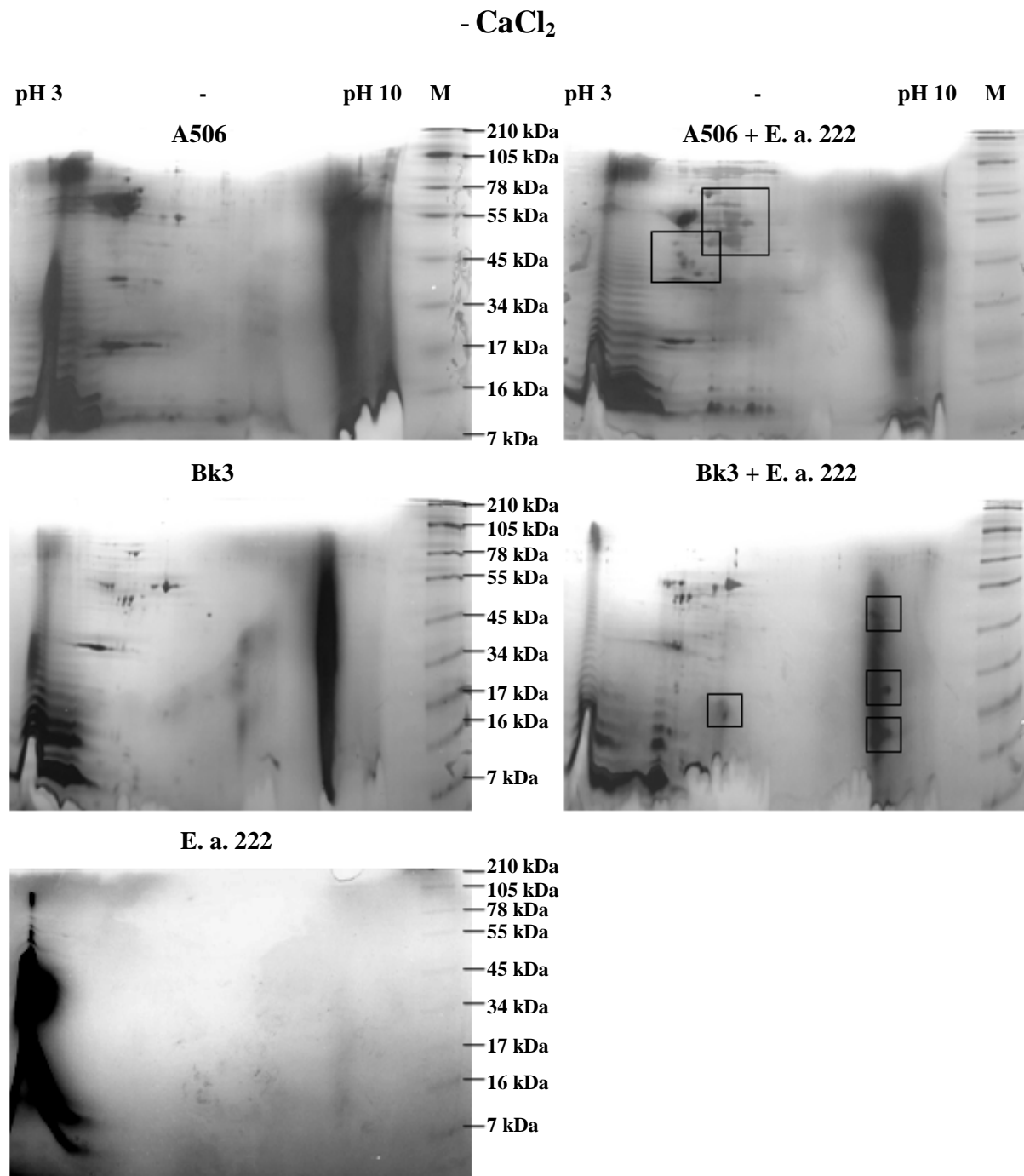


Abb. 3.6.3.2 2D-Gele der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, angezogen in Abwesenheit (A506, Bk3) oder Anwesenheit von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (A506/Bk3 + E. a. 222). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose. Bei Co-Kultur wurden zum Animpfen des Mediums gleiche Zellzahlen von Pathogen und Antagonist verwendet. Auftrag: je 150 µg Gesamtprotein. Der verwendete IPG-Streifen hatte einen pH-Range von pH 3-10, für die 2. Dimension wurde ein 9%iges Tris-Tricin-Gel verwendet. Gele wurden Silber-gefärbt. M: Marker See Blue. In Gegenwart von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE stärker exprimierte Spots wurden mittels eines schwarzen Kästchens markiert.

Im Vergleich der Anzuchtsmedien (M9-Medium mit und ohne 0,5 mM CaCl₂) sind von der veränderten Sekretion von Proteinen bei Co-Kultur von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in einem Medium mit CaCl₂ andere Proteine betroffen als in einem Medium ohne CaCl₂.

Eine Maskierung der tatsächlich durch den Feuerbranderreger beeinflussten Proteine von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 durch eine CaCl_2 -Supplementierung der Kulturmedien ist also möglich. Inwieweit die herauf- oder herunterregulierten Proteine allerdings in einem direkten Zusammenhang mit dem Antagonismus gegenüber dem Feuerbranderreger stehen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Zwar wurden Versuche unternommen, die Proteine mittels MALDI-TOF sequenzieren zu lassen, allerdings konnten keine signifikanten Ergebnisse damit erzielt und somit auch keine genaueren Aussagen getroffen werden.

3.7 Vorinkubationsversuche

Da durch die durchgeführte Mutagenese von *P. fluorescens* A506 und Bk3 keine Gene identifiziert wurden, deren Produkte in direktem Zusammenhang mit der Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE stehen könnten, wurden Vorinkubationsversuche durchgeführt. Hierbei wurde überprüft, ob eine Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE nur bei einem direktem Zellkontakt mit den Antagonisten stattfindet, oder aber auch extrazelluläre Komponenten mit inhibitorischer Wirkung durch die *P. fluorescens*-Stämme sekretiert werden.

Zusätzlich wurde untersucht, ob das Periplasma von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf den autobiolumineszenten Feuerbranderreger inhibitorisch wirksame Moleküle enthält.

3.7.1 Vorbehandlung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit hoch- und niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Für Vorinkubationsversuche wurden Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 hergestellt, indem die Bakterien drei Tage in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5 % Glukose und optional mit 0,5 mM CaCl_2 angezogen wurden. Nach Abtrennen der Zellen wurden die Wachstumsüberstände mittels eines Konzentrators (cut off 5 kDa) in eine hoch- (> 5 kDa) und eine niedermolekulare (< 5 kDa) Fraktion unterteilt.

Je 1×10^7 Zellen autobiolumineszente *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurden in einem Endvolumen von 10 μl mit 1 μg Protein der Wachstumsüberstände pro μl , 20 mM Hepes (pH 7,0) und 0,5% Glukose für 24 Stunden vorinkubiert. Zusätzlich wurden je 1×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit 5 μl der bei der Ankonzentration anfallenden niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände und 20 mM Hepes (pH 7,0) sowie 0,5% Glukose (in einem Endvolumen von 10 μl) für 24 Stunden vorinkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze mit gleicher Zellzahl von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und gleicher Konzentration von Hepes und Glukose, aber ohne Fraktionen der Wachstumsüberstände.

Nach 24 Stunden Vorinkubation wurden die Versuchsansätze punktförmig auf LB-Agar aufgetragen und die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE über einen Zeitraum von 48 Stunden gemessen.

Nach einer Vorinkubation von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit den ankonzentrierten Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte direkt nach Auftrag auf LB-Agar eine vollständige Reduktion der Biolumineszenz gezeigt werden. Nach 24 Stunden konnte zwar gezeigt werden, dass *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf der Agarplatte anwuchs, die gemessene Biolumineszenz war aber dennoch um durchschnittlich 74-80% im Vergleich zur Kontrolle reduziert und nach 48 Stunden immer noch um 35-44%. Die Vorinkubation mit der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 führte zu keiner Reduktion der Stoffwechselaktivität des Pathogens bei Auftrag auf LB-Agar (siehe Abbildung 3.7.1.1, A und B).

Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 beinhalteten demnach hochmolekulare Komponenten, die nach einer 24-stündigen Vorinkubation und anschließender Applikation auf LB-Medium in der Lage sind, *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zu hemmen.

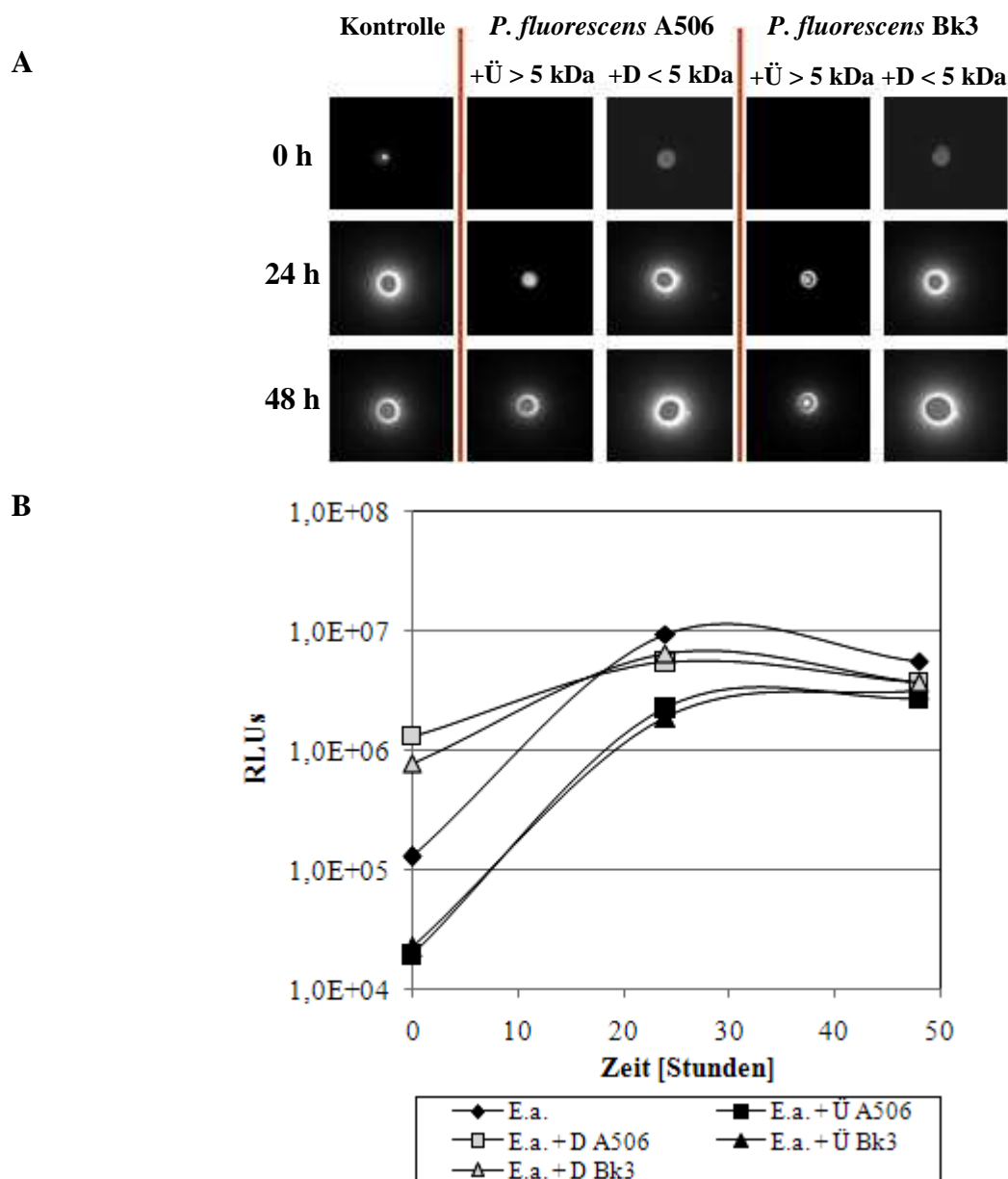


Abb. 3.7.1.1 A Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) nach Vorinkubation mit der hoch- bzw. niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506/Bk3). Jeweils 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurden mit $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein aus der hochmolekularen Fraktion ($\text{Ü} > 5 \text{ kDa}$) oder $5 \mu\text{l}$ der niedermolekularen Fraktion ($\text{D} < 5 \text{ kDa}$) versetzt, 24 Stunden vorinkubiert und in $10 \mu\text{l}$ Endvolumen (mit 20 mM Hepes pH 7,0 und $0,5\%$ Glukose) auf LB-Agar gespottet. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24 und 48 Stunden. (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4×4). **B** Quantifizierung der gemessenen Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) nach Vorinkubation mit der hoch- und niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Die Quantifizierung und Auswertung der gemessenen Biolumineszenz erfolgte mit IPLab und Excel 2000.

3.7.2 Vorbehandlung der Wachstumsüberstände mit Hitze bzw. pH-Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung

Wie zuvor aufgeführt, sezernieren *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in ihre Wachstumsüberstände hochmolekulare Substanzen mit inhibitorischer Wirkung auf *E. amylovora* 222. Die Hitzestabilität dieser Komponenten wurde überprüft, indem die hochmolekulare Fraktion für 10 Minuten auf 80°C erhitzt und anschließend für Vorinkubationsversuche eingesetzt wurde. Anschließend wurden die Vorinkubationsversuche wie zuvor beschrieben durchgeführt. Kontrollen wurden mit unbehandelten Wachstumsüberständen sowie ganz ohne Wachstumsüberstände angesetzt.

Mittels dieser Versuchsansätze konnte gezeigt werden, dass eine 10-minütige Erhitzung der Wachstumsüberstände die inhibitorische Wirkung auf den autobiolumineszenten Feuerbranderreger nahezu vollständig aufhebt. Die gemessene Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der erhitzten Wachstumsüberstände sowie die ihre Zunahme nach 24 und 48 Stunden auf LB-Agar ist vergleichbar mit der Kontrolle, die ohne Wachstumsüberstand vorinkubiert worden ist (Abb. 3.7.2.1 A und B).

Die von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sezernierten inhibitorisch wirksamen hochmolekularen Substanzen sind demnach hitzeempfindlich; es könnte sich hierbei beispielsweise um Enzyme handeln, die durch Erhitzung ihre biologisch aktive Tertiär- oder Quartärstruktur verlieren.

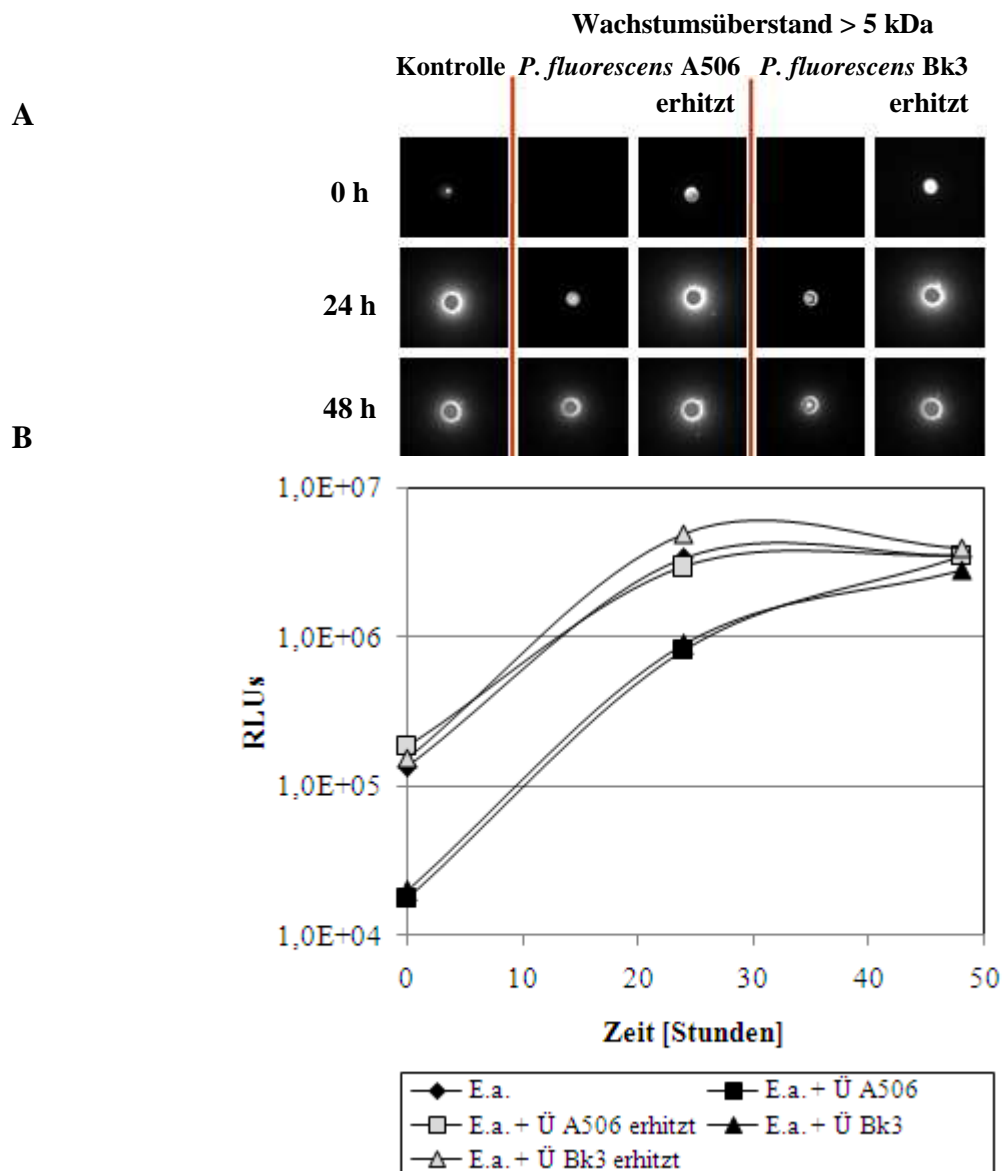


Abb. 3.7.2.1 A Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) nach Vorinkubation mit der unbehandelten bzw. erhitzten hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506/Bk3). Jeweils 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurden mit $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein aus der unerhitzten hochmolekularen Fraktion oder $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein aus der erhitzten hochmolekularen Fraktion („erhitzt“) versetzt und in $10 \mu\text{l}$ Endvolumen (mit 20 mM Hepes pH 7,0 und $0,5\%$ Glukose) nach 24 Stunden Vorinkubation auf LB-Agar gespottet. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24 und 48 Stunden. (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4×4). **B** Quantifizierung der gemessenen Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) nach Vorinkubation mit der unerhitzten und erhitzten hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Die Quantifizierung und Auswertung der gemessenen Biolumineszenz erfolgte mit IPLab und Excel 2000.

Kontrollen wurden auch hier wieder ohne Wachstumsüberstände, aber mit 20 mM Hepes bei den unterschiedlichen gewählten pH-Werten durchgeführt.

Unmittelbar nach Auftrag auf LB-Agar konnten für die Kontrollansätze und die Ansätze mit den Wachstumsüberständen keine eindeutigen Unterschiede gemessen werden. Lediglich bei pH 6,0 zeigten die Ansätze mit den Wachstumsüberständen eine ca. 40% geringere Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE als die Kontrolle; bei pH 8,0 hingegen konnte für den Ansatz mit der hochmolekularen Fraktion von *P. fluorescens* Bk3 eine 2,5-fach höhere Biolumineszenz im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden.

Nach 24 Stunden auf LB-Agar zeigten Ansätze mit der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bei pH 7,0 etwa 20-38% der Biolumineszenz, die für die Kontrolle gemessen werden konnte. Diese Werte sind vergleichbar mit den unter 3.7.1 erzielten Ergebnissen. Bei pH 6,0 konnte nur für Ansätze mit der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 eine Reduktion der Biolumineszenz *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf ca. 43% (im Vergleich zur Kontrolle) nach 24 Stunden gemessen werden, sowie auf etwa 56% nach 48 Stunden. Für *P. fluorescens* Bk3 wurden bei diesem pH keine inhibitorischen Effekte beobachtet. Genauso konnte für alle Ansätze bei pH 8,0 keine Reduktion der Biolumineszenz im Vergleich zum Kontrollansatz gezeigt werden, die gemessene Biolumineszenz entsprach der Kontrolle oder war vergleichsweise stärker (siehe Abb. 3.7.2.2, 3.7.2.3).

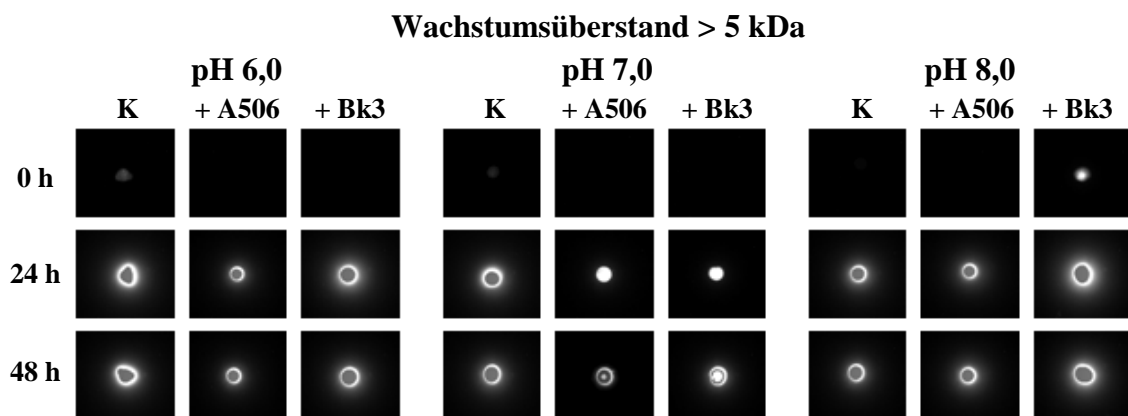


Abb. 3.7.2.2 Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) nach Vorinkubation mit der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506/Bk3). Jeweils 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurden mit $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein aus der hochmolekularen Fraktion versetzt und in $10 \mu\text{l}$ Endvolumen (mit 20 mM Hepes pH 6,0; 7,0; 8,0 und 0,5% Glukose) auf LB-Agar gespottet. Die Wachstumsüberstände wurden zuvor gegen 20 mM Hepes pH 6, 7 oder 8 dialysiert. K: Kontrolle ohne Wachstumsüberstände. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24 und 48 Stunden. (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4×4).

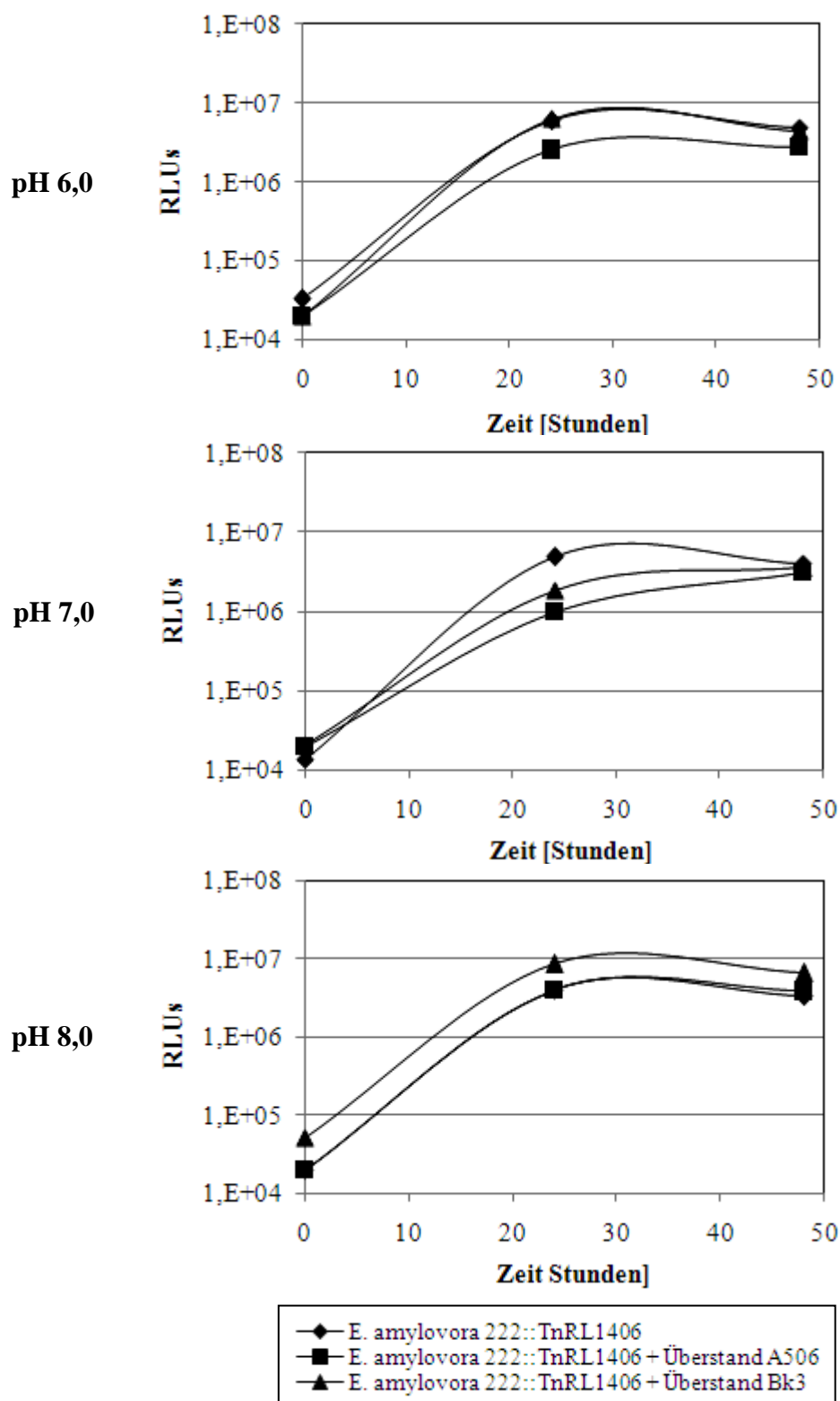


Abb. 3.7.2.3 Quantifizierung der gemessenen Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) nach Vorinkubation mit der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (Überstand A506/Bk3). Jeweils 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurden mit $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein aus der hochmolekularen Fraktion versetzt und in $10 \mu\text{l}$ Endvolumen (mit 20 mM Hepes pH 6,0; 7,0; 8,0 und 0,5% Glukose) nach 24 Stunden Vorinkubation auf LB-Agar gespottet. Die Wachstumsüberstände wurden zuvor gegen 20 mM Hepes pH 6, 7 oder 8 dialysiert. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24 und 48 Stunden. (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4×4). Die Quantifizierung und Auswertung der gemessenen Biolumineszenz erfolgte mit IPLab und Excel 2000.

Die Versuche zeigten, dass die inhibitorische Wirksamkeit der hochmolekularen Komponenten im Wachstumsüberstand von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 eine pH-Abhängigkeit aufweist. Proben von *P. fluorescens* A506 bei pH 7 zeigten eine 20% stärkere Hemmung der Biolumineszenz als bei pH 6; alle übrigen Ansätzen zeigte bei pH 6 und 8 gar keine Hemmung. Ebenso sind die Komponenten hitzeempfindlich und ihre inhibitorische Wirksamkeit ist durch Erwärmen auf 80°C inaktivierbar.

Beides könnte dafür sprechen, dass es sich bei den Komponenten um Proteine handelt, die durch Temperaturänderungen oder pH-Wert-Änderungen in ihrer Konformation oder Funktionalität eingeschränkt oder gestört werden, was in einer schlechteren oder fehlenden inhibitorischen Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE resultiert.

Weitergehende Untersuchungen von Vorinkubationsversuchen in Gegenwart der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von EDTA und Pronase K wurden zwar durchgeführt um mehr über den Charakter der hochmolekularen Substanzen zu erfahren, führten aber zu keinen signifikanten Ergebnissen (keine Abbildungen/Daten gezeigt).

3.7.3 Vorinkubation von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit hoch- und niedermolekularen Fraktionen des Periplasmas von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Die Isolierung des Periplasmas wurde aus Übernachtskulturen (in LB-Medium) von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 über einen osmotischen Schock mit Saccharose vorgenommen und das gewonnene Periplasma mittels Ankonzentratoren wie die Wachstumsüberstände in eine ankonzentrierte hoch- (> 5 Da) und eine niedermolekulare (< 5 kDa) Fraktion unterteilt.

Je 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurden entweder mit 3 µg Protein/µl aus der hochmolekularen Fraktion des Periplasmas, oder mit 5 µl der niedermolekularen Fraktion versetzt. Das Endvolumen der Ansätze betrug 10 µl bei einer Endkonzentration von 20 mM Hepes (pH 7,0) und 0,5% Glukose. Als Kontrolle dienten Ansätze mit gleicher Zellzahl von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und gleicher Konzentration von Hepes und Glukose, aber ohne Periplasmafraktionen. Nach 24 Stunden Vorinkubation wurden die Versuchsansätze punktförmig auf LB-Agar aufgetragen und die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE über einen Zeitraum von 48 Stunden gemessen.

Die hochmolekulare Fraktion des Periplasmas von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 führte zu einer deutlichen Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, was sowohl direkt nach Auftrag auf LB Agar (durchschnittlich 7-12% im Vergleich zur gemessenen Biolumineszenz der Kontrolle), nach 24 Stunden (durchschnittlich 51-59% im Vergleich zur gemessenen Biolumineszenz der Kontrolle) und nach 48 Stunden (durchschnittlich 55-57% im Vergleich zur gemessenen Biolumineszenz der Kontrolle) festgestellt werden konnte.

Die niedermolekulare Fraktion zeigte hingegen keine eindeutige Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Zwar lag die gemessene Biolumineszenz 24 bzw. 48 Stunden nach

Auftrag auf LB-Agar bis zu 25% unter der gemessenen Biolumineszenz für die Kontrolle, allerdings konnten direkt nach Auftrag auf LB-Agar keine Unterschiede in der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bei Vorinkubation in Gegenwart der niedermolekularen Fraktionen des Periplasmas im Vergleich zur Kontrolle ohne Periplasma festgestellt werden (Abb. 3.7.3.1, A und B).

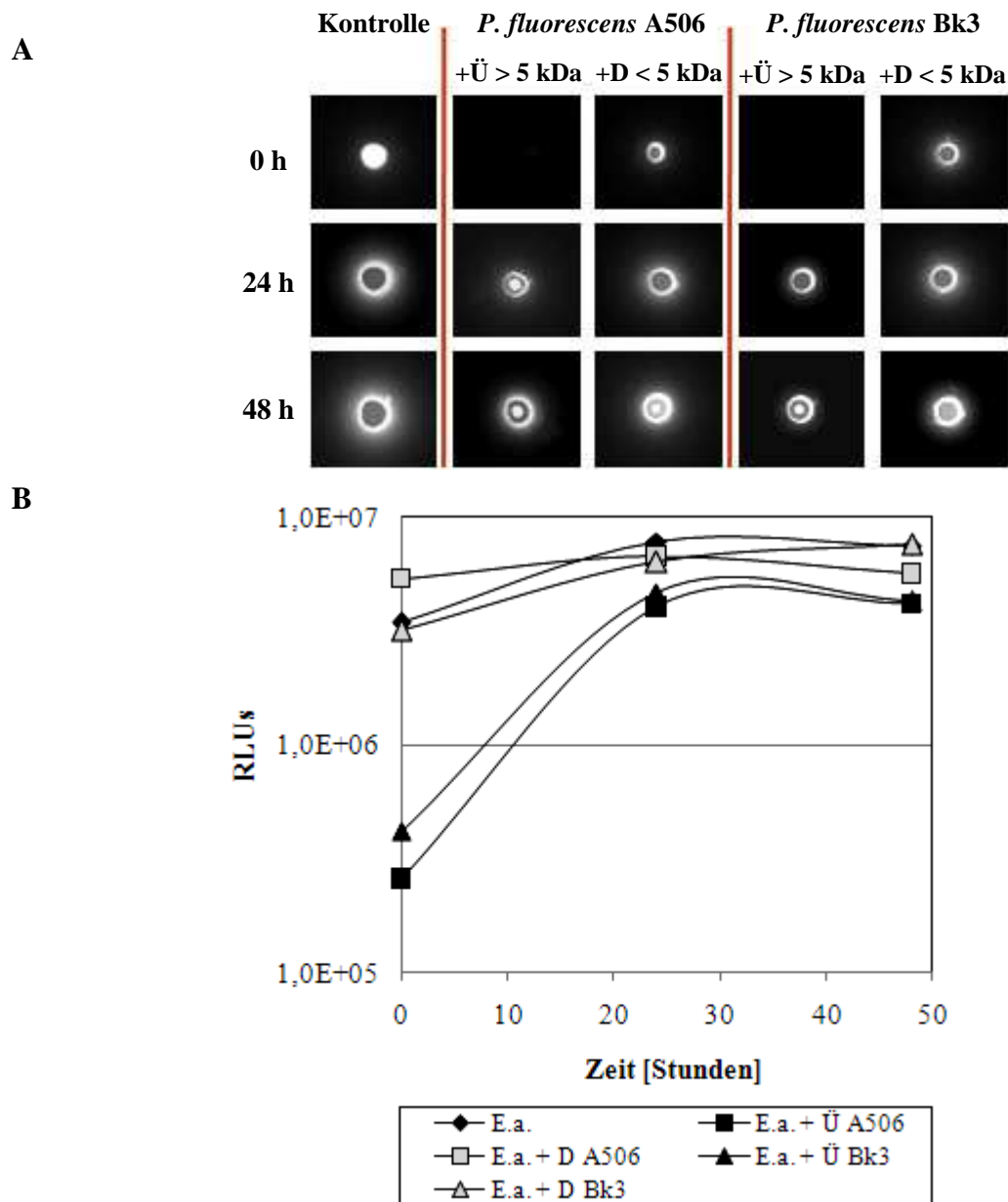


Abb. 3.7.3.1 A Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) nach Vorinkubation mit der hoch- bzw. niedermolekularen Fraktion des Periplasmas von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506/Bk3). Jeweils 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurden mit $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein aus der hochmolekularen Fraktion ($\bar{U} < 5 \text{ kDa}$) oder $5 \mu\text{l}$ der niedermolekularen Fraktion ($D > 5 \text{ kDa}$) versetzt und in $10 \mu\text{l}$ Endvolumen (mit 20 mM Hepes pH 7,0 und $0,5\%$ Glukose) nach 24 Stunden Vorinkubation auf LB-Agar gespottet. K: Kontrolle ohne Periplasma. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24 und 48 Stunden. (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4×4). **B** Quantifizierung der gemessenen Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) nach Vorinkubation mit der hoch- und niedermolekularen Fraktion des Periplasmas von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Die Quantifizierung und Auswertung der gemessenen Biolumineszenz erfolgte mit IPLab und Excel 2000.

Wie die hochmolekulare Fraktion der zellfreien Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, zeigt auch die hochmolekulare Fraktion des Periplasmas eine inhibitorische Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Allerdings ist die inhibitorische Wirksamkeit der Wachstumsüberstände insgesamt nachhaltiger und durchschnittlich um 31-33% stärker nach 24 Stunden, bzw. 13-20% nach 48 Stunden als die des Periplasmas.

3.8 Hemmhoftests in Gegenwart von ganzen Zellen oder Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Vanneste et al. (1992) beschreibt, dass *Pantoea agglomerans* Eh252 antibiotische Substanzen produziert, die nur dann inhibitorisch wirksam gegenüber *E. amylovora* sind, sofern der Inhibierungsversuch auf Minimalmedium stattfindet.

Mit einem modifizierten Minimalmedium wurde die inhibitorische Wirkung von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie ihrer Wachstumsüberstände auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE untersucht und beobachtet, ob mögliche inhibitorische Wirkungen hier verstärkt im Vergleich zu Dual Culture Tests oder Vorinkubationsversuchen (siehe 3.2 und 3.7) ausfallen. Als Kriterium wurde die Ausbildung von Hemmhöfen beobachtet.

Übernachtskulturen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurden ohne vorheriges Waschen der Zellen 1:3 mit Wasser verdünnt, je 100 µl (ca. 9×10^7 Zellen) auf einem Minimalmedium ausplattiert und ca. $6,5 \times 10^7$ Zellen der Wildtypen und der in dieser Arbeit erstellten Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in die Mitte der Agarplatten gespottet.

Nach dem gleichen Prinzip wurden diese Versuche mit hoch- und niedermolekularen Fraktionen von Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 durchgeführt, sowie mit Proben, die nach einer Gelfiltration mit niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gewonnen worden waren.

Die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurde ggf. nach null, einem und zwei Tagen gemessen.

3.8.1 Hemmhoftests in Gegenwart von ganzen Zellen

Wie zuvor beschrieben, wurden verdünnte Übernachtskulturen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf Minimalmedium ausplattiert, ca. $6,5 \times 10^7$ Zellen (in 15 µl LB-Medium) der Wildtypen und Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in die Mitte der Agarplatte gespottet und anschließend über einen Zeitraum von zwei Tagen die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE gemessen. Die Belichtungszeit für die Biolumineszenzbilder betrug 5 Sekunden, Gain 3, Binning 4 x 4. Die Platten wurden bei Raumtemperatur inkubiert.

Wurde ausschließlich *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf dem gewählten Minimalagar ausplattiert, so wuchs der autobiolumineszente Feuerbranderreger gut flächendeckend auf

dem Medium an und zeigte nach 24 Stunden eine deutlich messbare Biolumineszenz. Wurden allerdings *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in die Mitte der Platte gespottet, so war bereits nach 24 Stunden im Bereich um die Kolonie der Antagonisten eine deutliche Abnahme der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zu beobachten. Nach 48 Stunden hatte sich dieser Bereich weiter ausgedehnt und wurde zu einer lytischen Zone, wo kein Wachstum des Feuerbranderregers mehr beobachtet werden konnte (Abb. 3.8.1.1 A und B). Eine Rückisolierung des Feuerbranderregers aus diesem Bereich durch Überführung von etwas Agar in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin schlug fehl; es ist davon auszugehen, dass *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Bereich der lytischen Zone abgestorben ist. Die Ausbildung von Hemmhöfen bei gleicher Versuchsdurchführung auf LB-Medium konnte nicht beobachtet werden (keine Abb. gezeigt).

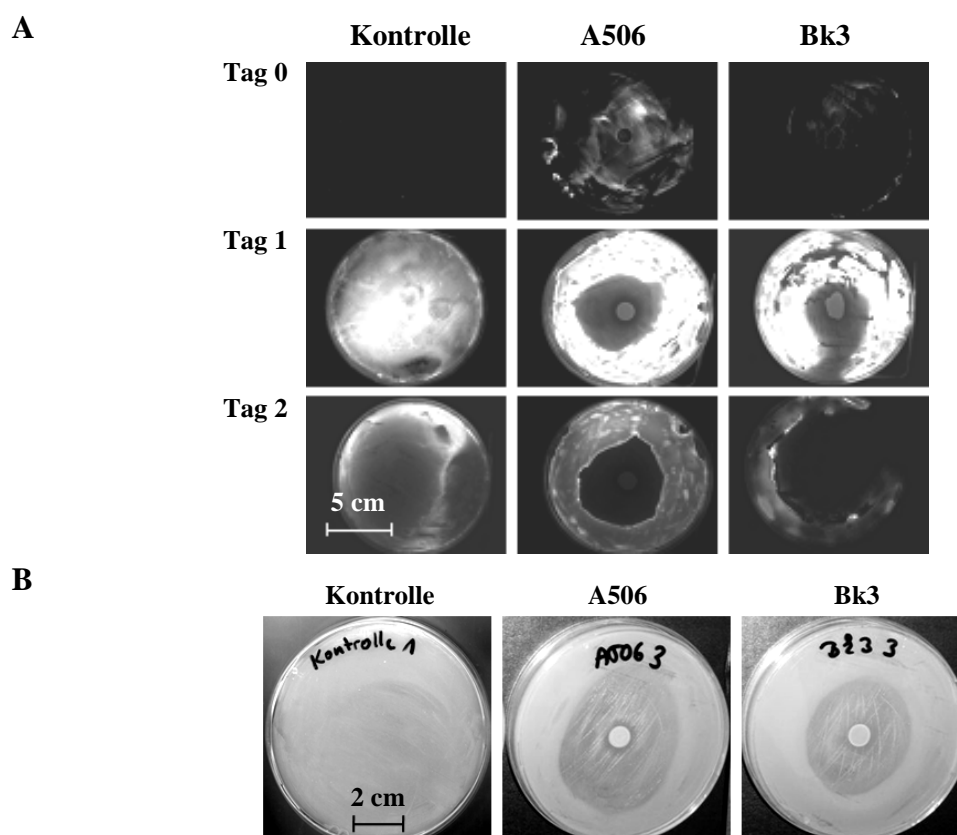


Abb. 3.8.1.1 A Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhofest von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch *P. fluorescens* A506 oder Bk3 (A506, Bk3) auf Minimalmedium. Belichtungszeit 5 Sekunden, Gain 3, Binning 4 x 4. **B** Lichtbilder der Hemmhofests auf Minimalmedium mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen (100 µl, in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils ca. $6,5 \times 10^7$ Zellen einer Übernachtskultur der gewählten Antagonisten (in LB-Medium). Kontrolle: ohne Antagonist.

Die Ausbildung von Hemmhöfen auf Minimalmedium konnte nicht nur durch den Wildtyp von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 beobachtet werden, sondern auch durch die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Mutanten (3.3). Die Durchführung des Versuches erfolgte wie bereits zuvor beschrieben ebenfalls unter Einsatz von $6,5 \times 10^7$ Zellen (in LB-Medium) der Mutanten.

Für nahezu alle Mutanten (ausgenommen *P. fluorescens* Bk3 #16-22) konnte nach 24 Stunden Inkubation eine deutliche Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Bereich um die Kolonie der Mutanten beobachtet werden.

Die Reduktion der Biolumineszenz nach 24 Stunden fiel bei einigen Mutanten zwar geringer aus als bei den Wildtypen (*P. fluorescens* A506 #8-42 und #29-60, *P. fluorescens* Bk3 #8-28 und #16-22), nach 48 Stunden konnte aber wie bei den Wildtypen eine deutliche Ausdehnung der Reduktion der Biolumineszenz gezeigt werden, sowie die Ausbildung von lytischen Zonen, wo kein Wachstum des autobiolumineszenten Feuerbranderreger mehr zu beobachten gewesen ist (Abb. 3.8.1.2 und 3.8.1.3, A und B).

In Dual Culture Tests mit gleicher Zellzahl von Mutant und Feuerbranderreger auf dem nicht-limitierenden LB-Medium, das als Selektionsmedium für die Mutanten diente, konnte hingegen keine so ausgeprägte inhibitorische Wirkung gezeigt werden (vergleiche 3.3.2).

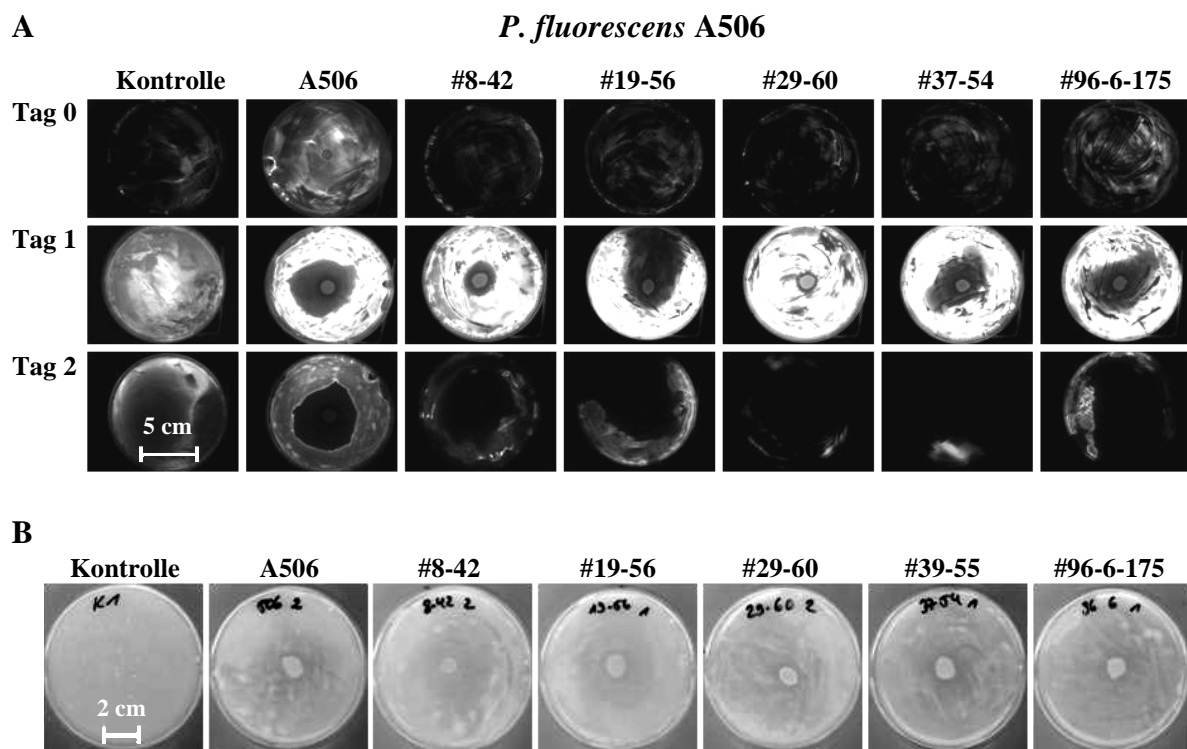


Abb. 3.8.1.2 A Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch Mutanten von *P. fluorescens* A506 auf Minimalmedium. Belichtungszeit 5 Sekunden, Gain 3, Binning 4 x 4. **B** Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* A506 nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$ in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils ca. $6,5 \times 10^7$ Zellen einer Übernachtskultur von *P. fluorescens* A506 (Wildtyp oder Mutante, in LB-Medium) Kontrolle: ohne Antagonist. A506: Wildtyp *P. fluorescens* A506. #8-42: Mutante *P. fluorescens* A506 #8-42. #19-56: Mutante *P. fluorescens* A506 #19-56, #29-60: Mutante *P. fluorescens* A506 #29-60, #37-54: Mutante *P. fluorescens* A506 #37-54, #96-6-175: Mutante *P. fluorescens* A506 #96-6-175.

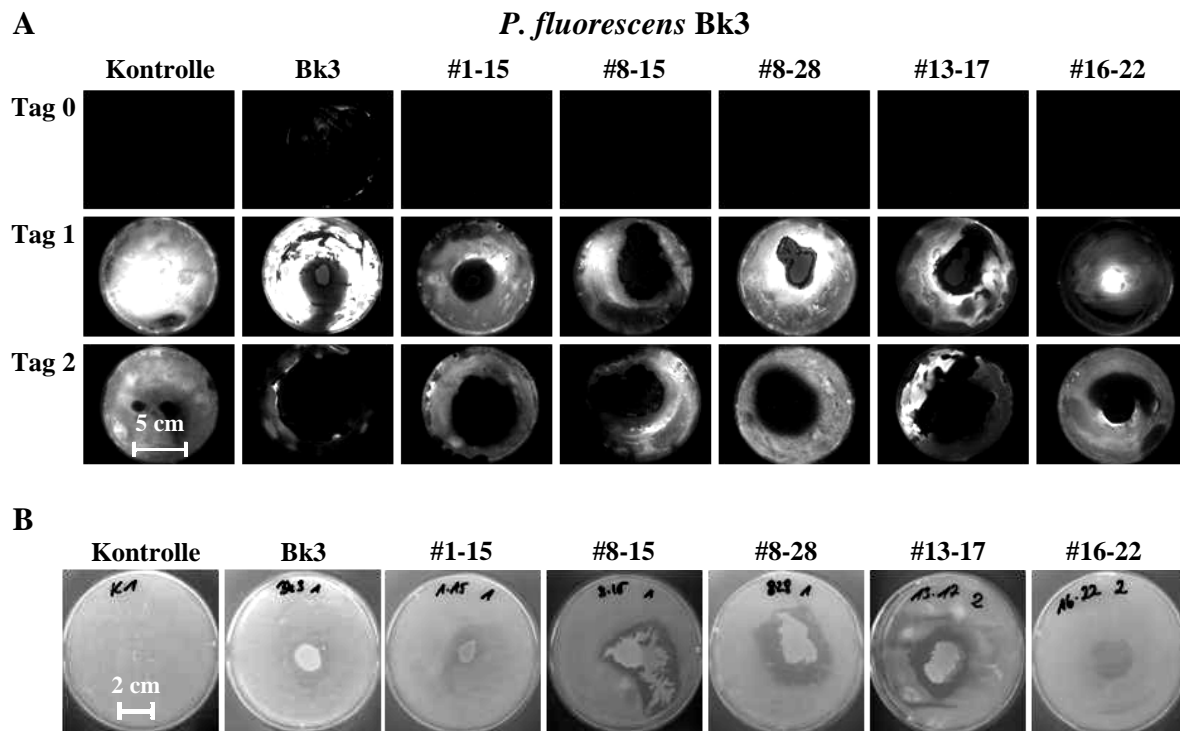


Abb. 3.8.1.3 A Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch Mutanten von *P. fluorescens* Bk3 auf Minimalmedium. Belichtungszeit 5 Sekunden, Gain 3, Binning 4 x 4 **B** Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* Bk3 nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden ca. 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils ca. $6,5 \times 10^7$ Zellen einer Übernachtskultur von *P. fluorescens* Bk3 (Wildtyp oder Mutante) Kontrolle: ohne Antagonist. Bk3: Wildtyp von *P. fluorescens* Bk3. #1-15: Mutante *P. fluorescens* Bk3 #1-15. #8-15: Mutante *P. fluorescens* Bk3 #8-15, #8-28: Mutante *P. fluorescens* Bk3 #8-28, #13-17: Mutante *P. fluorescens* Bk3 #13-17, #16-22: Mutante *P. fluorescens* Bk3 #16-22.

Die Ergebnisse zeigen, dass – unabhängig von der Mutagenese – sowohl Wildtyp als auch Mutanten von intakten Zellen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 extrazelluläre Komponenten in das hier gewählte Kulturmedium absondern, die sich zum einen inhibitorisch auf die Stoffwechselaktivität von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auswirken (erkennbar an der deutlichen Abnahme der Biolumineszenz), zum anderen möglicherweise auch eine Lyse der Zellen des Feuerbranderreger bewirken (deutliche lytische Bereiche um die Kolonien von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 [Wildtyp und Mutanten]).

Unter Eisenmangelbedingungen produzieren *P. fluorescens*-Stämme Siderophore; hierbei handelt es sich um niedermolekulare Moleküle, die die Funktion haben, Eisen zu binden und so der Zelle bereit zu stellen (Varma und Chincholkar, 2007). In Gegenwart von 0,1-0,2 mM FeCl_3 wird die Bildung von Siderophoren unterdrückt (Joyner und Lindow 2000; Rachid und Ahmed, 2005).

Eine Involvierung von Siderophoren in die Inhibierung von Pathogenen von Pflanzen ist bereits beschrieben worden. Als Beispiel soll hier das System *P. fluorescens* – *E. carotovora* var. *carotovora* (Erreger der Knollen-Nassfäule bei Kartoffeln) genannt werden (Helmy et al.,

2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob möglicherweise durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 produzierte Siderophore an der Ausbildung der Hemmhöfe beteiligt sind.

Die zuvor beschriebenen Versuchsansätze wurden dafür unter Supplementierung des Minimalmediums mit 0,2 mM FeCl_3 wiederholt und auf eine Ausbildung eines Hemmhofes um die Kolonien von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 hin beobachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von 0,2 mM FeCl_3 im verwendeten Minimalmedium die Ausbildung der Hemmhöfe deutlich geringer ausfiel als auf Medium, dem nicht FeCl_3 zugesetzt wurde. Ein vollständiges Fehlen der Hemmhöfe lag allerdings nicht vor (Abb. 3.8.1.4).

Dünnschichtchromatographie-Analysen von der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in Gegenwart von 0,2 mM FeCl_3 angezogen worden waren, ergaben, dass in Gegenwart von FeCl_3 einige Substanzen nicht mehr sekretiert wurden, die ohne FeCl_3 allerdings in der niedermolekularen Fraktion zu finden waren (siehe 3.12.2). Es ist möglich, dass diese Komponenten an der Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beteiligt sind und ihr Fehlen zu einer weniger effektiven Inhibierung durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Minimalmedium führte, das mit 0,2 mM FeCl_3 supplementiert wurde. Genauso ist es möglich, dass es sich bei diesen fehlenden Komponenten um Siderophore handelt.

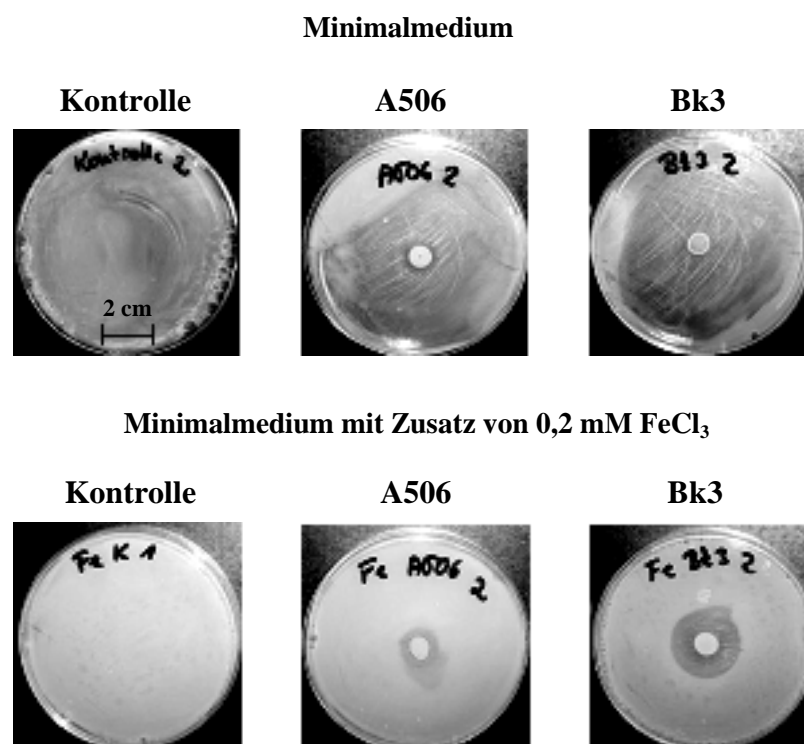


Abb. 3.8.1.4 Lichtbilder der Hemmhoftests mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506, Bk3) auf Minimalmedium mit und ohne 0,2 mM FeCl_3 nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$, in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils ca. $6,5 \times 10^7$ Zellen einer Übernachtskultur von *P. fluorescens* A506 oder Bk3 (in LB-Medium). Kontrolle: ohne Antagonist.

3.8.2 Hemmhoftests in Gegenwart von Wachstumsüberständen

Im Zuge dieser Arbeit sind Hemmhoftests mit zellfreien, hoch- und niedermolekularen Fraktionen von Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 durchgeführt worden. Die Versuche wurden wie zuvor beschrieben angesetzt, allerdings wurden entweder 10 µg Protein aus der gegen 20 mM Hepes (pH 7,0) dialysierten hochmolekularen Fraktion (Moleküle > 5 kDa; „Überstand“) der Wachstumsüberstände in einem Endvolumen von 15 µl oder 15 µl der niedermolekularen Fraktion (Moleküle < 5 kDa; „Durchfluss“) mittig aufgespottet.

Wie in den zuvor durchgeführten Versuchen mit intakten Zellen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte für alle Versuchsansätze bereits nach 24 Stunden eine deutliche Reduzierung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden. Nach 48 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur hatte sich diese Reduktion deutlich intensiviert. Ausgehend vom Auftragsort der Wachstumsüberstände konnte die Ausbildung einer lytischen Zone gezeigt werden, wo kein Wachstum von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mehr zu beobachten war (Abb. 3.8.2.1, A und B). Eine Rückisolierung des Feuerbranderreger aus diesem Bereich durch Überführung von etwas Agar in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin schlug fehl; es ist davon auszugehen, dass *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Bereich der lytischen Zonen vollständig inaktiviert wurde.

Diese Versuche zeigen, dass sowohl in der hochmolekularen Fraktion als auch in der niedermolekularen Fraktion Moleküle vorhanden sein müssen, die sich inhibitorisch auf das Wachstum des Feuerbranderreger auswirken und möglicherweise zu einer Lyse von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE führen.

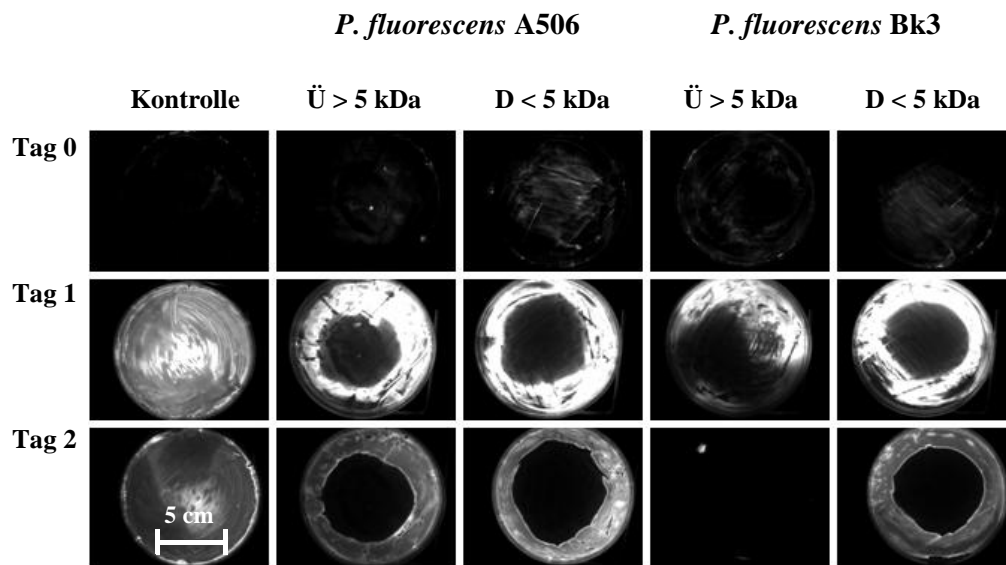
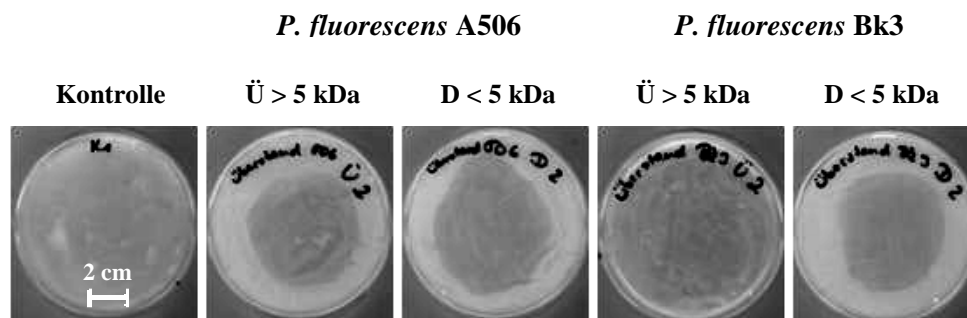
A**B**

Abb. 3.8.2.1 A Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch hoch ($\bar{U} > 5$ kDa)- und niedermolekulare ($D < 5$ kDa) Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Minimalmedium. Belichtungszeit 5 Sekunden, Gain 3, Binning 4 x 4. **B** Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit hoch- und niedermolekularen Fraktionen von Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils $10 \mu\text{g}$ Protein/ $15 \mu\text{l}$ aus der hochmolekularen Fraktion (Überstand) bzw. $15 \mu\text{l}$ aus der niedermolekularen Fraktion (Durchfluss) der Wachstumsüberstände. Kontrolle ohne Wachstumsüberstände.

Wie bei den Vorinkubationsversuchen (siehe 3.7.2) wurde zur weiteren Charakterisierung überprüft, ob die hoch- und niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände nach Erhitzung für zehn Minuten auf 80°C noch eine hemmende Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausübt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass Komponenten sowohl der hochmolekularen als auch die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 hitzeinstabil sind und es zu einem Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE kam.

Weder konnte wie in den zuvor beschriebenen Versuchen eine Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden, noch führten die hitzebehandelten Fraktionen der Wachstumsüberstände zur Ausbildung einer lytischen Zone (Abb. 3.8.2.2).

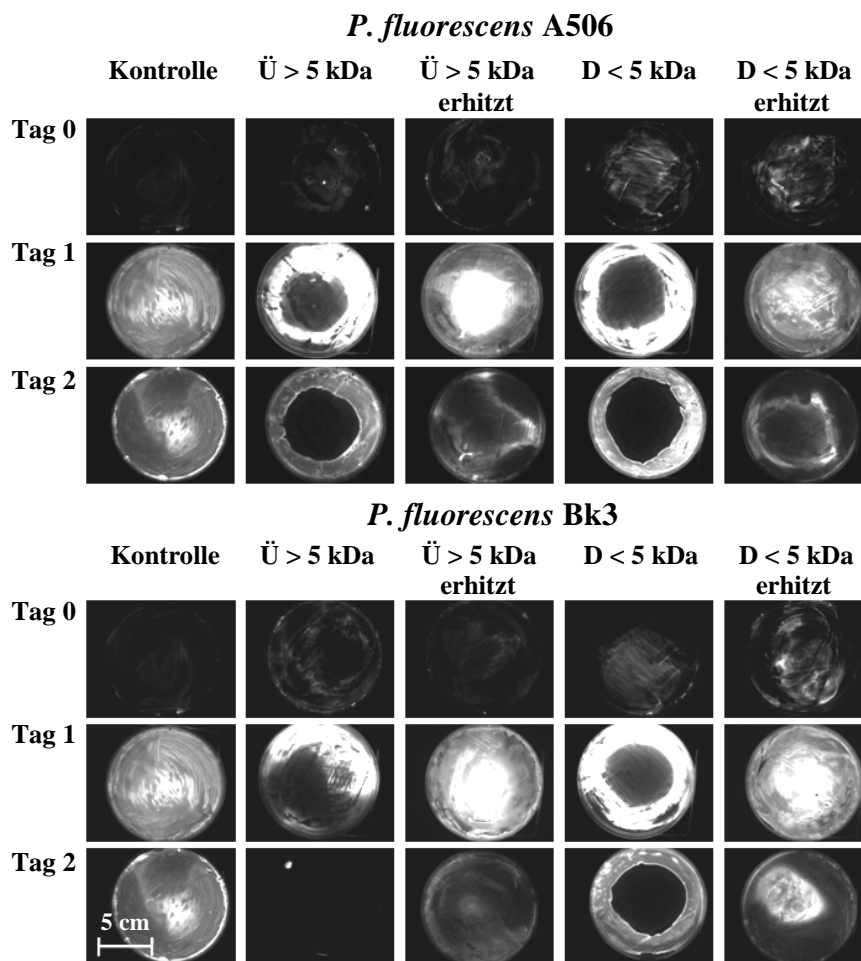


Abb. 3.8.2.2 Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch unbehandelte oder hitzebehandelte hoch- bzw. niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Minimalmedium. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$ in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils $10 \mu\text{g}$ Protein/ $15 \mu\text{l}$ aus der hochmolekularen Fraktion ($\bar{U} > 5 \text{ kDa}$) bzw. $15 \mu\text{l}$ aus der niedermolekularen Fraktion ($D < 5 \text{ kDa}$) der Wachstumsüberstände. Kontrolle ohne Wachstumsüberstände. Belichtungszeit 5 Sekunden, Gain 3, Binning 4×4 .

Während der Fraktionierung der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 fällt eine hoch- und eine niedermolekulare Fraktion an (siehe 2.18). Dabei erfährt die hochmolekulare Fraktion eine Konzentrationssteigerung ca. um den Faktor 420 (50 ml werden auf ca. $150 \mu\text{l}$ hochmolekulare Fraktion eingengt). Es sollte daher überprüft werden, ob zum einen die hochmolekulare Fraktion in ihrer ursprünglichen Konzentration sich ebenfalls hemmend auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auswirkt bzw. die niedermolekulare auch nach einer Verdünnung noch inhibitorisch wirksam ist. Die hochmolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 wurden daher 1:10, 1:100 und 1:500 mit destilliertem sterilen Wasser verdünnt, die niedermolekularen 1:2 und 1:5. Für die Versuche wurden anschließend jeweils $15 \mu\text{l}$ der einzelnen Verdünnungsstufen verwendet; die Hemmhoftests wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Bei den hochmolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände konnte für *P. fluorescens* A506 für die unverdünnte und die 1:10 verdünnte Probe bereits nach 24 Stunden eine

Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden, für *P. fluorescens* Bk3 nur für die unverdünnte Probe. Nach 48 Stunden konnte allerdings für alle Verdünnungsstufen der hochmolekularen Fraktionen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowohl eine Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, sowie die Ausbildung einer lytischen Zone im Bereich des Auftragsortes der Proben beobachtet werden (Abb. 3.8.2.3, nur Biolumineszenzbilder). Die Größe der lytischen Zone war bei einer Verdünnung von 1:10 noch mit unverdünnten Proben vergleichbar, bei einer Verdünnung von 1:100 und 1:500 betrug sie nur etwa 1/3 der Größe der unverdünnten Proben.

Eine Rückverdünnung der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände bis über das Ausgangsvolumen der Probe hinaus ist demnach möglich, ohne dass es zum vollständigen Verlust der inhibitorischen Wirkung der Proben gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE kommt.

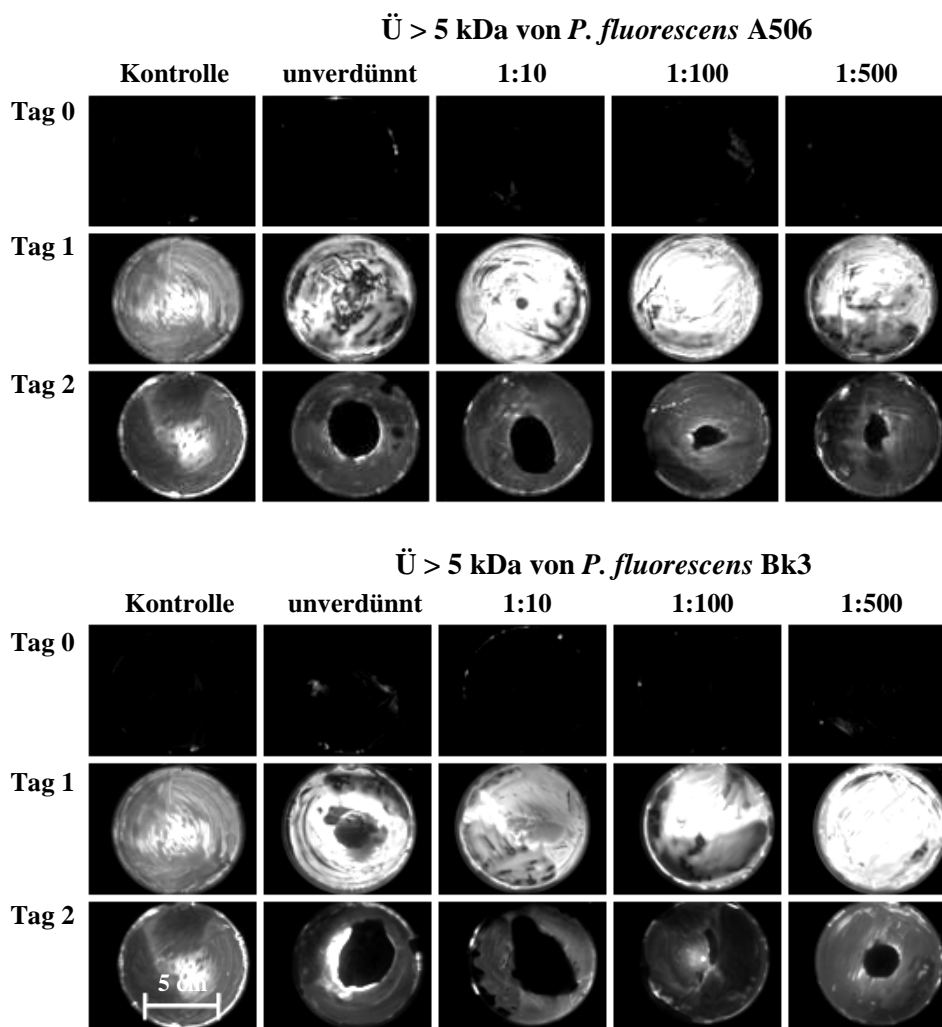


Abb. 3.8.2.3 Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch verdünnte hochmolekulare Fraktionen ($\bar{M}_w > 5$ kDa) der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Minimalmedium. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$ in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils $15 \mu\text{l}$ der einzelnen Verdünnungsstufen der hochmolekularen Fraktionen. Kontrolle ohne Wachstumsüberstände. Belichtungszeit 5 Sekunden, Gain 3, Binning 4×4 .

Wird die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 verdünnt, so ist die inhibitorische Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ab einer 1:2 Verdünnung bei Proben von *P. fluorescens* A506 nicht mehr zu beobachten, bei *P. fluorescens* Bk3 ab einer Verdünnung von 1:5 nicht mehr (Abb. 3.8.2.4). Generell wirkte sich die inhibitorische Wirkung in den Verdünnungsstufen erst nach 48 Stunden deutlich sichtbar aus, sodass eine Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zu sehen war, bzw. die Ausbildung einer lytischen Zone gezeigt werden konnte.

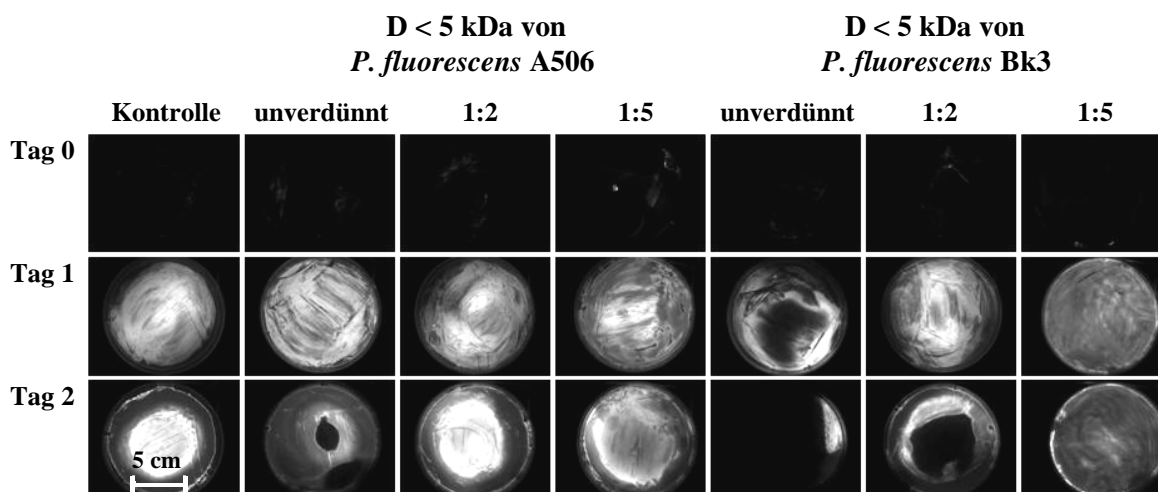


Abb. 3.8.2.4 Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmhoftest von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch verdünnte niedermolekulare Fraktionen ($D < 5$ kDa) der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Minimalmedium. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils $15 \mu\text{l}$ der einzelnen Verdünnungsstufen der niedermolekularen Fraktionen. Kontrolle ohne Wachstumsüberstände. Belichtungszeit 5 Sekunden, Gain 3, Binning 4×4 .

Eine vollständige Rückverdünnung der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände war insofern möglich, als dass auch bei einer 1:500 Verdünnung eine Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE noch beobachtet werden konnte.

Eine Verdünnung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände führte hingegen sehr schnell zu einem Verlust ihrer inhibitorischen Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE.

Unter 3.8.1 konnte bereits gezeigt werden, dass in Gegenwart von 0.2 mM FeCl_3 die Hemmung des autbiolumineszenten Feuerbranderregers durch Zellen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 deutlich geringer ausfällt, d.h. deutlich kleinere Hemmhöfe auf Minimalmedium ausgebildet werden.

Vergleichende Tests wurden aus diesem Grund mit hoch- und niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in M9-Medium mit $0,2 \text{ mM FeCl}_3$ angezogen worden sind, durchgeführt.

Die Versuche wurden wie zuvor beschrieben mit $10 \mu\text{g}$ Protein (in $15 \mu\text{l}$) bzw. $15 \mu\text{l}$ der niedermolekularen Fraktion durchgeführt.

Die Untersuchungen zeigten, dass die hochmolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände, die durch Anzucht der Bakterien in Gegenwart von FeCl_3 gewonnen worden war, noch immer eine (wenn auch reduzierte) inhibitorische Wirkung auf den *E. amylovora* 222 aufwies, aber keine hemmende Wirkung mehr durch die niedermolekulare Fraktion festgestellt werden konnte (Abb. 3.8.2.5).

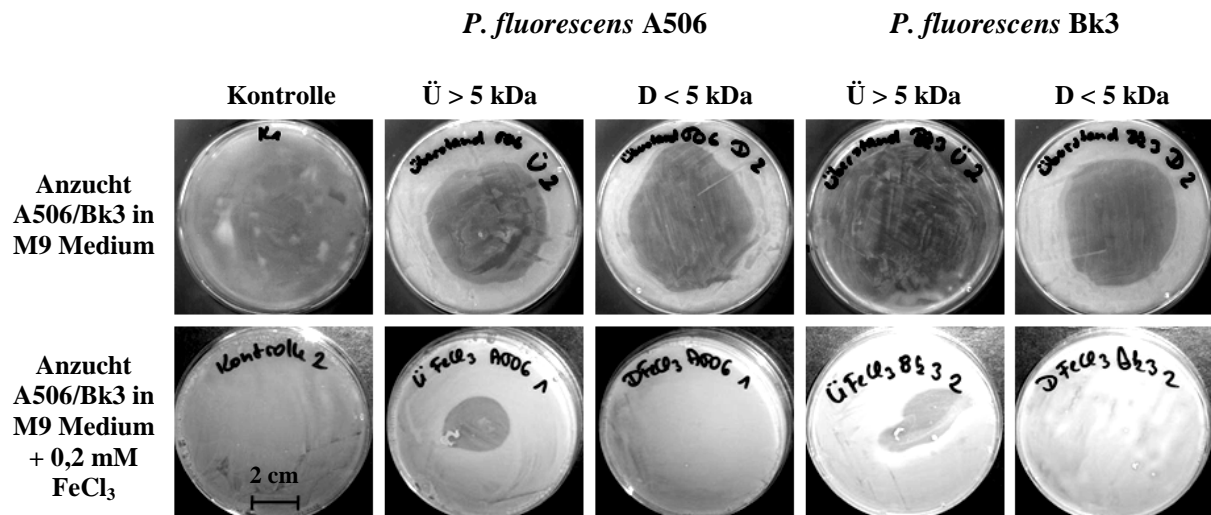


Abb. 3.8.2.5 Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit hoch ($\bar{U} > 5$ kDa)- bzw. niedermolekularen ($D < 5$ kDa) Fraktionen von Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506/Bk3), angezogen in M9-Medium, optional mit 0,2 mM FeCl_3 , nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden ca. 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$ in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils $10 \mu\text{g}$ Protein/ $15 \mu\text{l}$ aus der hochmolekularen Fraktion ($\bar{U} > 5$ kDa) bzw. $15 \mu\text{l}$ aus der niedermolekularen Fraktion ($D < 5$ kDa) der Wachstumsüberstände.

Die Ergebnisse bestätigen die zuvor durchgeführten Untersuchungen, bei der durch intakte Zellen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 deutlich kleinere Hemmhöfe auf einem mit 0,2 mM FeCl_3 supplementierten Minimalmedium als auf einem Medium ohne FeCl_3 ausgebildet worden sind. Dennoch wurde die inhibitorische Wirkung nicht vollständig aufgehoben. Die Supplementierung des Kulturmediums mit FeCl_3 könnte also möglicherweise Einfluss auf die Produktion oder Sekretion extrazellulärer Komponenten nehmen.

Diese Annahme konnte durch die Untersuchung der niedermolekularen Fraktion mit Dünnschichtchromatographie bestätigt werden (siehe 3.12.2).

3.9 Nachweis der Cyanwasserstoff-Produktion durch verschiedene *P. fluorescens*-Stämme und *E. amylovora* 222

Die Produktion von HCN durch *P. fluorescens*-Stämme ist bereits bekannt und in der Literatur beschrieben worden (Corbell und Loper, 1995; Lorck, 1948; Paul und Sarma, 2006; Reddy et al., 2008). Ein Zusammenhang der HCN-Produktion mit einem Antagonismus gegenüber anderen Organismen wird hierbei angenommen.

Aus diesem Grund ist untersucht worden, ob *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 ebenfalls HCN-Produzenten sind.

Neben diesen beiden Stämmen sind noch andere Stämme – *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und *P. fluorescens* 2-79 sowie zusätzlich *P. fluorescens* Pf-5 als Positivkontrolle (Corbell et Loper, 1995) – mit untersucht worden. Zusätzlich ist eine Negativkontrolle ohne Bakterien angesetzt worden.

Ausschließlich für die Versuchsansätze mit der Positivkontrolle *P. fluorescens* Pf-5 konnte ein Farbumschlag der Pikrinsäure von gelb nach orange-braun beobachtet werden, während die Säure bei allen anderen Ansätzen ihre gelbe Farbe behielt (Abb. 3.9.1). Somit konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von HCN mittels Pikrinsäure möglich ist, aber die hier untersuchten Antagonistenstämme *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 keinen Cyanwasserstoff produzieren, der für einen Antagonismus gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE verantwortlich sein könnte.

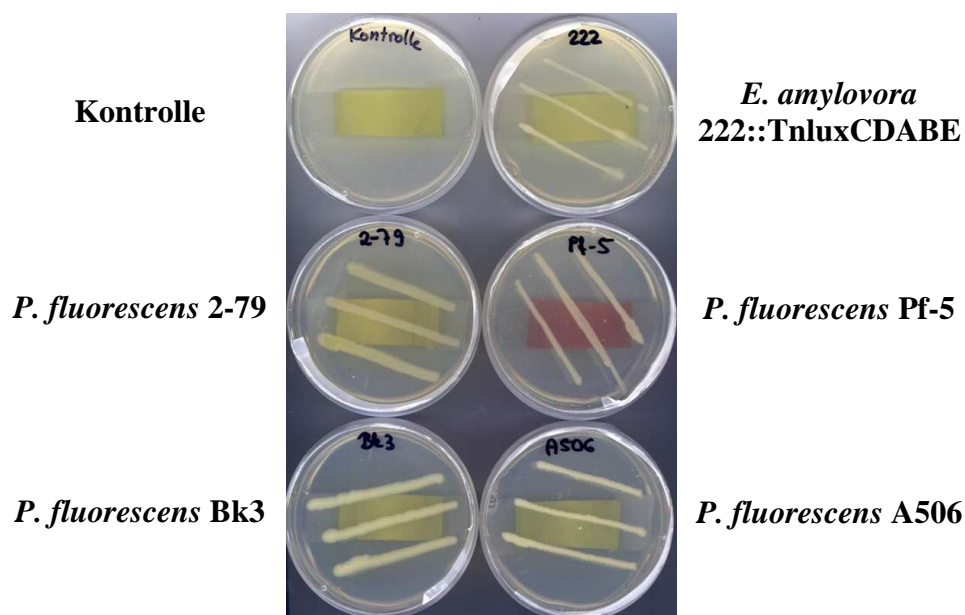


Abb. 3.9.1 Pikrinsäuretest zum Nachweis von HCN nach 2 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Von oben links nach unten rechts: Kontrolle ohne Bakterien, *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, *P. fluorescens* 2-79, *P. fluorescens* Pf-5, *P. fluorescens* Bk3, *P. fluorescens* A506.

3.10 Produktion von 2,4- Diacetylphloroglucinol (DAPG), Phenazin-1-Carbonsäure (PCA) und Pyoluteorin (PLT) durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3?

Die Produktion der Antibiotika DAPG, PCA und PLT ist unter Pseudomonaden weit verbreitet und ihr Zusammenhang mit der Kontrolle von Phytopathogenen bereits diskutiert worden (De Souza und Raaijmakers, 2003; Raaijmakers et al., 1997).

Mittels einer HPLC-Analyse sollte untersucht werden, ob *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zu den *Pseudomonas*-Stämmen gehören, die diese Antibiotika produzieren.

Als Referenz-Antibiotika dienten reines DAPG, PCA und PLT, welche unter den gewählten Chromatographie-Bedingungen Retentionszeiten von 26 (PCA), 28 (PLT) und 32 (DAPG) Minuten zeigten (siehe Abb. 3.10.1 A).

In der Ethylacetat-Extraktion der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes (< 5 kDa) von *P. fluorescens* A506 konnten drei Komponenten mit Retentionszeiten von ca. 21, 22 und 23 Minuten festgestellt werden (Abb. 3.10.1 B). In der Ethylacetat-Extraktion der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes (< 5 kDa) von *P. fluorescens* Bk3 konnte eine Komponente mit einer Retentionszeit von ca. 27,5 Minuten nachgewiesen werden. Detektierbare Level von DAPG, PCA und PLT konnten allerdings bei beiden Stämmen nicht gefunden werden (Abb. 3.10.1 C).

Mit Ethylacetat konnten Komponenten aus den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 extrahiert werden, bei denen es sich aber nicht um die genannten Antibiotika, sondern um Komponenten von zunächst unbekannter Natur handelte. Mittels Dünnschichtchromatographie konnte gezeigt werden, dass es sich bei einer der Komponenten, die aus der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 isoliert worden ist, vermutlich um Salizylsäure handelt (siehe 3.11.2 und 3.11.3).

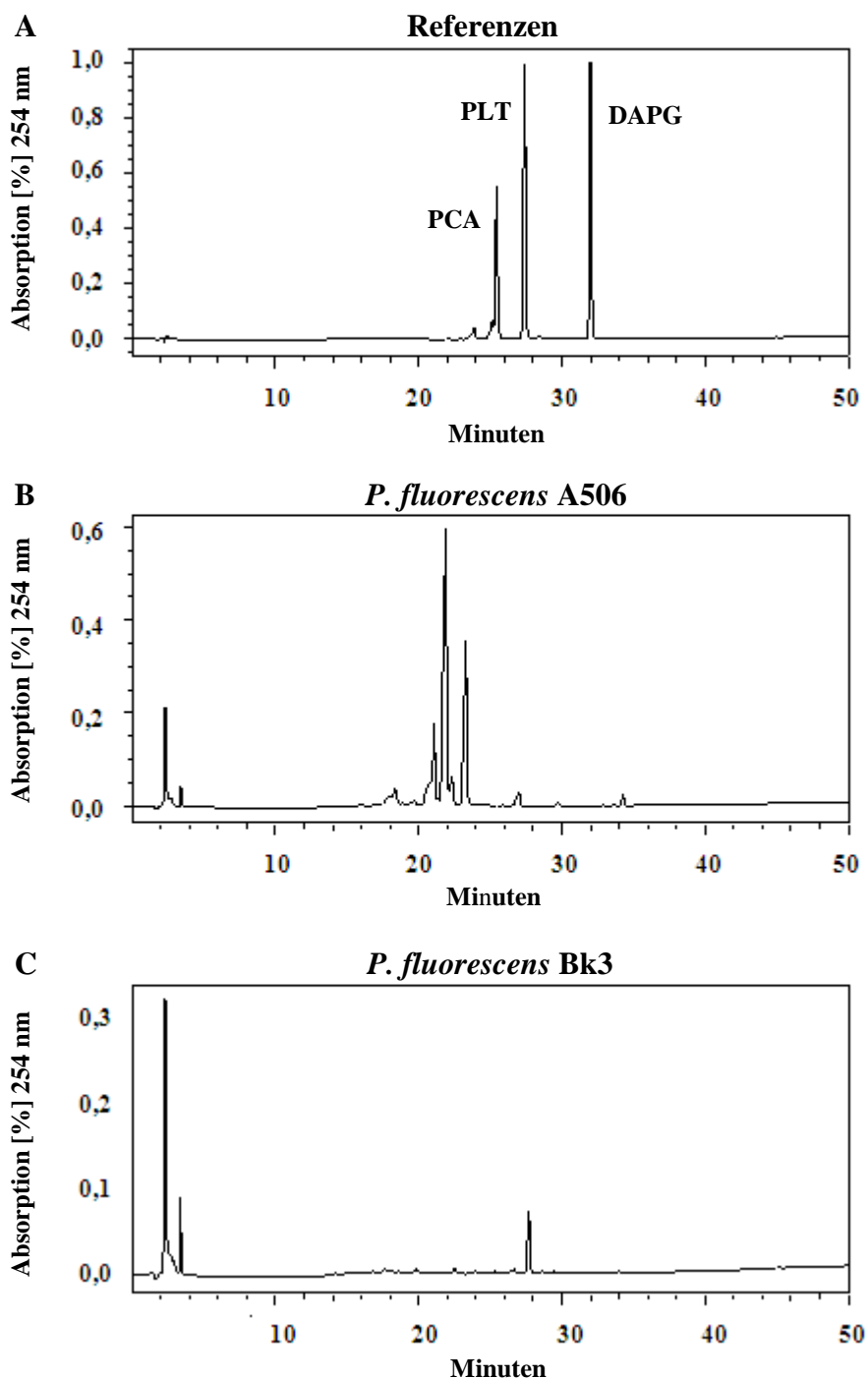


Abb. 3.10.1 Nachweis der Produktion von DAPG, PCA und PLT bei *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. **A** Referenzen mit Standards von DAPG, PCA und PLT. **B** Ethylacetat-Extrakt aus der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes (< 5 kDa) von *P. fluorescens* A506. **C** Ethylacetat-Extrakt aus der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes (< 5 kDa) von *P. fluorescens* Bk3. Ausgehend von 4 ml gefriergetrockneter Ethylacetatextrakt-Probe, die in 200 µl Methanol aufgenommen wurde, wurden 50 µl für die HPLC verwendet. Die HPLC wurde mit einer C18 reverse phase symmetry Säule von Waters durchgeführt, an die ein Lösungsmittelgradient (0-100 % Acetonitril + 0,1% Trifluoressigsäure in 40 Minuten, 8 Minuten bei 100% Acetonitril + 0,1% Trifluoressigsäure, 0,5 ml/Minute) angelegt worden ist.

3.11 Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

3.11.1 Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit Gelfiltration

Die in dieser Arbeit durchgeführte Gelfiltration diente zur Fraktionierung der niedermolekularen, zellfreien Fraktion (< 5 kDa) der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, um anschließend mit einzelnen gewonnenen Fraktionen Hemmhoftests mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf Minimalagar (siehe 3.11.4) durchführen zu können, bzw. Analysen der einzelnen Fraktionen mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie (siehe 3.11.2 und 3.11.3) zu ermöglichen. Jeweils 30 ml der niedermolekularen Fraktion wurden zuvor mit der SpeedVac bei 45°C auf ca. 1,5 ml eingengt und auf eine 50 cm lange Säule mit Sephadex G-25 aufgetragen. Als Laufmittel diente destilliertes Wasser. Von der Säule eluierte Moleküle wurden mit einem UV-Detektor bei 280 nm detektiert. Die Gelfiltration fand bei 4°C statt. Im Vergleich wurden zum einen niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände untersucht, bei denen *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose angezogen worden waren, zum anderen erfolgte die Anzucht in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,2 mM FeCl₃.

In Abwesenheit von FeCl₃ konnten in der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 jeweils zwei Peaks mit Retentionszeiten von 41-42 und 60-62 Minuten detektiert werden (Abb. 3.11.1.1 A), die getrennt voneinander in zwei Fraktionen aufgefangen worden sind. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mit der SpeedVac für Dünnschichtchromatographie-Analysen wieder auf ca. 150 µl eingengt, bzw. unverdünnt für Hemmhoftests eingesetzt. Die Retentionszeiten und Volumina der einzelnen Peaks/Fraktionen sind zusätzlich aus Tabelle 3.11.1.1 zu entnehmen.

Werden *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ angezogen, so kann in der niedermolekularen Fraktion dieser Wachstumsüberstände für beide Proben nur noch ein Peak mit einer Retentionszeit von 59-60 Minuten detektiert werden, während der erste Peak, der sonst mit einer Retentionszeit von 41-42 Minuten gezeigt werden konnte, vollständig fehlte (Tabelle 3.11.1.1, Abb. 3.11.1.1 B).

Tab. 3.11.1.1 Retentionszeiten der Peaks bzw. Fraktionen aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit destilliertem Wasser als Laufmittel. Die niedermolekulare Fraktion stammte aus Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose und optional mit 0,2 mM FeCl₃ angezogen worden waren. RT = Retentionszeit, Vol. = Volumen

| | Peak | M9 | | M9 + 0,2 mM FeCl ₃ | |
|----------------------------|------|----------|-----------|-------------------------------|-----------|
| | | RT (Min) | Vol. (ml) | RT (Min) | Vol. (ml) |
| <i>P. fluorescens</i> A506 | 1 | 41 | 25 | --- | |
| | 2 | 62 | 50 | 60 | 46 |
| <i>P. fluorescens</i> Bk3 | 1 | 42 | 23 | --- | |
| | 2 | 60 | 46 | 59 | 24 |

Sowohl in der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 als auch der von Bk3 wird nach ca. 41-42 Minuten bzw. nach ca. 60-62 Minuten eine Substanz oder ein Substanzgemisch von der Gelfiltrationssäule eluiert. Die Intensität des ersten Peaks ist dabei deutlich geringer als die des zweiten Peaks. Gleichzeitig ist die Intensität beider Peaks bei *P. fluorescens* A506 deutlich größer als bei *P. fluorescens* Bk3 (ca. 20% bei Peak 1 und ca. 26% bei Peak 2).

Bei Anzucht von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ fehlt in der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände bei beiden Stämmen Peak 1. Es wird demnach ein reduziertes Spektrum niedermolekularer Substanzen sekretiert. Die Anwesenheit der Eisenionen führte vermutlich zu einer veränderten Sekretion oder Expression von niedermolekularen Bestandteilen.

Alle Peaks wurden für Dünnschichtchromatographie-Analysen, Massenspektrometrie und Hemmhoftests aufgefangen. Entweder wurden die Peaks unfractioniert aufgefangen, oder in 2-Minuten Fraktionen á ca. 3,5 ml. Proben für die Dünnschichtchromatographie wurden in der SpeedVac bei 45°C auf ca. 150 µl eingengt. Für Proben, die in Gegenwart von FeCl₃ angezogen worden waren und bei denen Peak 1 fehlte, wurde auch die von der Gelfiltrationssäule kommende Fraktion von Minute 35-45 aufgefangen (was der Gesamt-Retentionszeit von Peak 1 entsprechen würde). Auch diese wurde mittels SpeedVac auf ca. 150 µl ankonzentriert und mittels Dünnschichtchromatographie untersucht.

Die Dünnschichtschromatographie bestätigte zusätzlich zu der Gelfiltration das veränderte Spektrum sekretierter Substanzen bei Anzucht von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ (siehe 3.11.2).

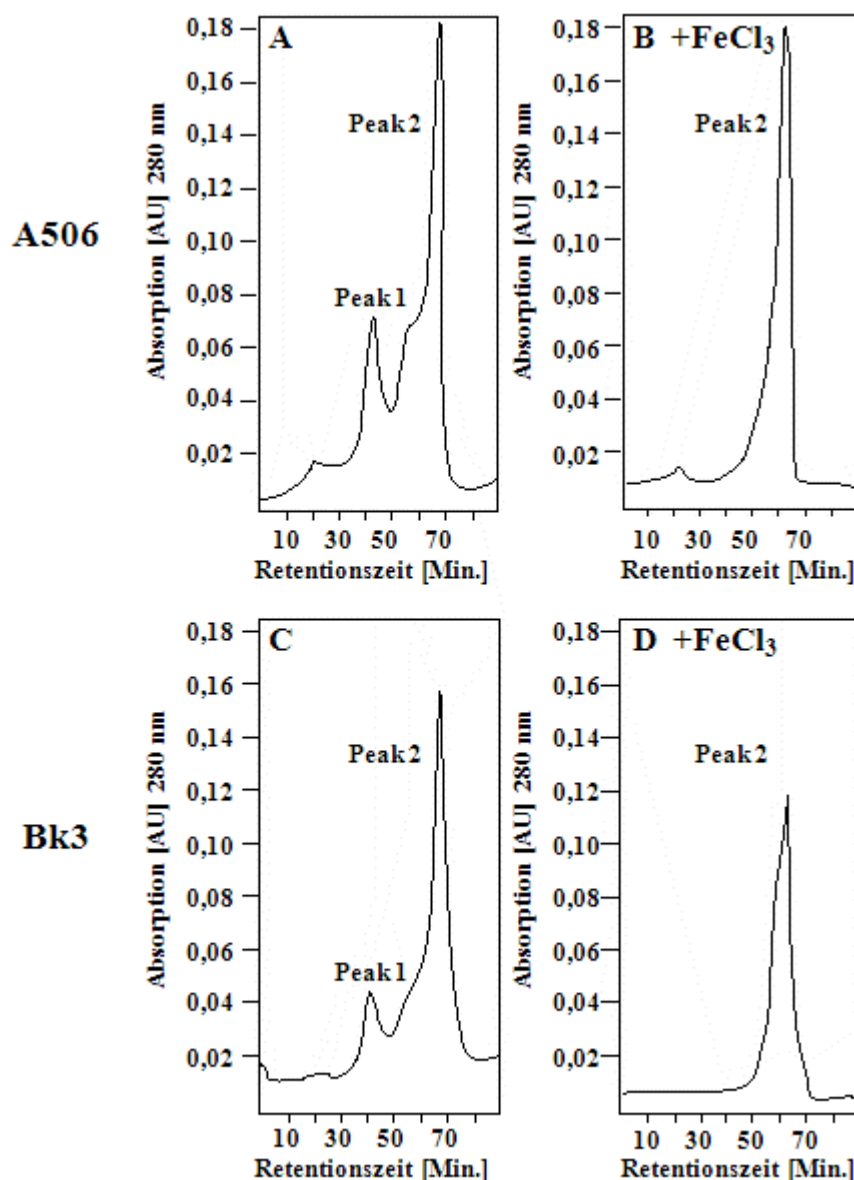


Abb. 3.11.1.1 Chromatogramme der Gelfiltrationen von den niedermolekularen Fraktionen (< 5 kDa) der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. **A und C** Niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bei Anzucht der Bakterien in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose. **B und D** Niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bei Anzucht der Bakterien in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,2 mM FeCl_3 . Als Proben dienten jeweils 30 ml der niedermolekularen Fraktion, die auf 1,5 ml mit der SpeedVac bei 45°C ankonzentriert worden war. Laufmittel: destilliertes Wasser, Detektion mit UV-Licht.

3.11.2 Analyse der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 nach Gelfiltration mittels Dünnschichtchromatographie

In der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnten jeweils 2 Peaks in Unterfraktionen von 3,5 ml getrennt aufgefangen und mittels SpeedVac ankonzentriert werden (siehe 3.11.1). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie auf ihre Zusammensetzung hin untersucht; als stationäre Phase wurde Kieselgel Si_{60} mit einem UV-Indikator verwendet, als

mobile Phase 70 % Ethanol. Die Auswertung erfolgte mittels UV-Licht, Ninhydrin- sowie Eisen-Reagenz-Färbung.

Dünnschichtchromatographie-Analyse der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände bei Anzucht der Bakterien in M9-Medium

Bei Anzucht der Bakterien in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose konnte in Peak 1 von *P. fluorescens* A506 zwei voneinander abgegrenzte Spots mit blau-grüner Fluoreszenz sowie ein Spot mit oranger Fluoreszenz mit RF-Werten zwischen 0,02 und 0,34 detektiert werden. Für Peak 1 von *P. fluorescens* Bk3 wurden drei Spots mit derselben Fluoreszenz und RFs zwischen 0,02 und 0,24 beobachtet. Alle Spots aus Peak 1 waren mit Ninhydrin anfärbbar und zeigten eine violette oder orange-gelbe Färbung, was auf das Vorhandensein primärer und sekundärer Amine in den Spots hinweist (Abb. 3.11.2.1 A und B).

Eine Anfärbung der Spots aus Peak 1 mit Eisen-Reagenz war nicht möglich (keine Abbildung gezeigt).

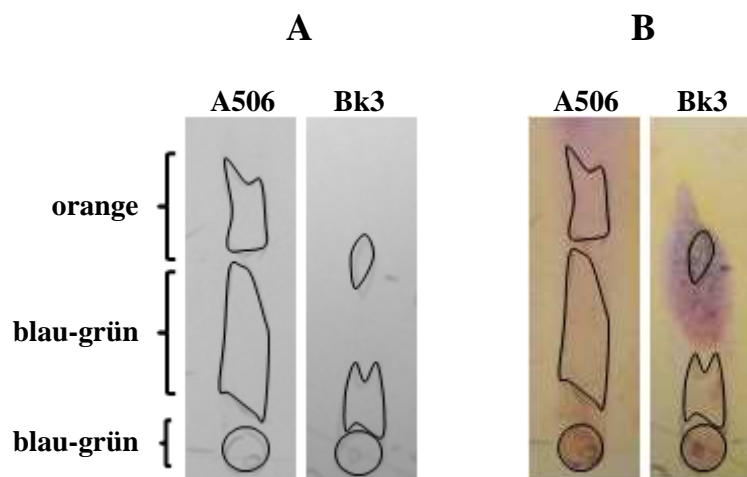


Abb. 3.11.2.1 DC von Peak 1 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506/Bk3). **A** Färbung der aufgetrennten Komponenten von Peak 1 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 unter UV-Licht (312 nm). **B** Ninhydrinfärbung der aufgetrennten Komponenten von Peak 1 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Die niedermolekularen Fraktionen stammten aus Kulturen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose angezogen worden waren. Von jeder Probe wurden 7 µl aufgetragen. Die DC wurde mit Polygram® SIL G UV₂₅₄ Platten und 70% Ethanol durchgeführt.

In Peak 2 von *P. fluorescens* A506 wurden vorwiegend Spots mit violetter Fluoreszenz unter UV-Licht detektiert, während ein Spot eine orange Fluoreszenz aufwies. Die RF-Werte lagen hier zwischen 0,73 und 0,90. Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3 bestand hingegen aus einem Spot mit violetter Fluoreszenz, zwei Spots mit blauer und einem Spot mit oranger Fluoreszenz unter UV-Licht. Die RF-Werte lagen hier zwischen 0,56 und 0,88 (Abb. 3.11.2.2). Keiner der Spots aus Peak 2 konnte mit Ninhydrin gefärbt werden (keine Abbildung gezeigt), allerdings zeigten alle violetten Spots aus Peak 2 von *P. fluorescens* A506 eine mehr oder weniger stark

ausgeprägte Violettfärbung nach Behandlung mit Eisen-Reagenz, wobei der oberste (RF-Wert 0,90) die intensivste Färbung aufwies.

Zusätzlich zu den Proben aus der Gelfiltration wurde ein Salizylsäure-Standard (1% Salizylsäure in 96% Ethanol, 7 µl) mit aufgetragen. Der Salizylsäurestandard zeigte ebenfalls eine ausgeprägte violette Fluoreszenz unter UV-Licht, eine violette Färbung nach Behandlung mit Eisen-Reagenz sowie einen RF-Wert von 0,9. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Peak 2 von *P. fluorescens* A506 Salizylsäure enthält.

Aus Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3 konnte keiner der Spots mit Eisen-Reagenz angefärbt werden (Abb. 3.11.2.2). Der oberste violette Spot wies mit 0,88 nahezu denselben RF-Wert auf wie der Salizylsäurestandard, dennoch konnte für diese Probe Salizylsäure nicht eindeutig nachgewiesen werden.

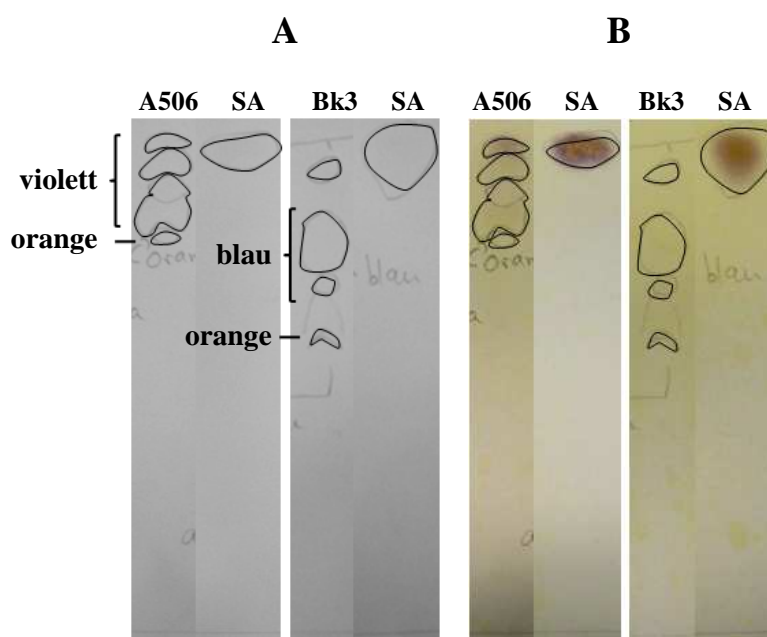


Abb. 3.11.2.2 DC von Peak 2 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506/Bk3). **A** Färbung der aufgetrennten Komponenten von Peak 2 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 unter UV-Licht (312 nm). **B** Eisen-Reagenz-Färbung der aufgetrennten Komponenten von Peak 2 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3; SA= Salizylsäurestandard (1% in 96% Ethanol). Die niedermolekularen Fraktionen stammen aus Kulturen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose angezogen worden waren. Von jeder Probe wurden 7 µl aufgetragen. Die DC wurde mit Polygram® SIL G UV₂₅₄ Platten und 70% Ethanol durchgeführt.

Die RF-Werte der einzelnen Spots sowie ihre Fluoreszenz-Farbe unter UV-Licht sind in Tabelle 3.11.2.1 am Ende dieses Kapitels aufgeführt.

Da eine vollständige Abtrennung einzelner Spots voneinander durch die hier verwendete Gelfiltration nicht möglich war, wurden in Abbildung 3.11.2.1 und 3.11.2.2 Fraktionen gezeigt, die alle beschriebenen Spots beinhalteten.

Dünnschichtchromatographie-Analyse der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände bei Anzucht der Bakterien in M9-Medium mit 0,2 mM FeCl₃

Wurden niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gewonnen, die in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,2 mM FeCl₃ angezogen worden waren, so konnte in der Gelfiltration nur noch Peak 2 nach ca. 60 Minuten detektiert werden, während Peak 1 vollständig fehlte (siehe 3.11.1). Dennoch wurden neben Peak 2 auch Fraktionen aufgefangen, die der Retentionszeit von Peak 1 entsprachen hätten.

Die anschließend durchgeführte Dünnschichtchromatographie bestätigte die Ergebnisse der Gelfiltration; in der Fraktion, die Peak 1 entsprachen hätte, waren keine Spots mehr nachweisbar.

In Peak 2 von *P. fluorescens* A506 fehlte der oberste Spot mit einem RF-Wert von 0,9 und violetter Fluoreszenz, der im Vorfeld als Salizylsäure detektiert worden war. In Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3 konnten in Bezug auf die Fluoreszenzfärbung unter UV-Licht fast alle Spots detektiert werden. Der oberste Spot mit nahezu demselben RF-Wert wie Salizylsäure (0,88) fehlte allerdings ebenfalls (Abb. 3.11.2.3 A und B).

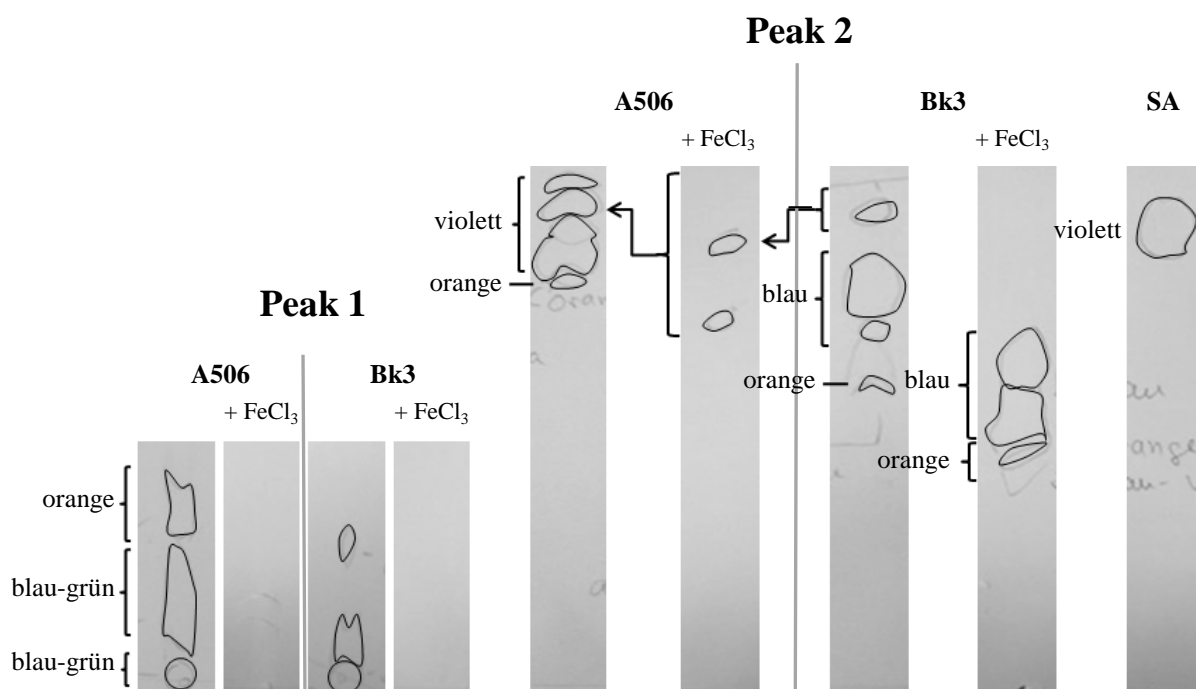


Abb. 3.11.2.3 DC aus Fraktion 1 und 2 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506/Bk3; siehe 3.12.1). **Peak 1** Fraktion 1 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 unter UV-Licht. **Peak 2** Färbung der aufgetrennten Komponenten von Peak 2 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 unter UV-Licht (312 nm). SA= Salizylsäurestandard (1% in 96% Ethanol). Die niedermolekularen Fraktionen stammten aus Kulturen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und optional 0,2 mM FeCl₃ angezogen worden waren. Von jeder Probe wurden 7 µl aufgetragen. Die DC wurde mit Polygram® SIL G UV₂₅₄ Platten und 70% Ethanol durchgeführt.

Die RF-Werte der detektierten Spots, bei denen die Proben in Gegenwart von FeCl_3 angezogen worden waren, wichen von den ermittelten RF-Werten für Proben, die nicht in Gegenwart von FeCl_3 kultiviert wurden, teilweise ab. Die hier verwendeten Proben wurden allerdings während der Gelfiltration nicht wie zuvor beschrieben in 3,5 ml-Unterfraktionen aufgefangen, sondern Peak 2 als Gesamtfraktion. Diese hier fehlende Unterfraktionierung könnte dazu geführt haben, dass keine saubere Abtrennung einzelner Spots voneinander stattgefunden hat.

Die RF-Werte der einzelnen Spots sowie ihre Fluoreszenz-Farbe unter UV-Licht sind in Tabelle 3.11.2.1 am Ende dieses Kapitels aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass Peak 2 von *P. fluorescens* A506 Salizylsäure beinhaltet. In Gegenwart von Eisenionen wird die Synthese und Freisetzung dieser – aber auch anderer niedermolekularer Komponenten aus Peak 1 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit blau-grüner bzw. oranger Fluoreszenz – unterdrückt.

Die Gegenwart von FeCl_3 führt damit zur Exkretion eines reduzierten Spektrums extrazellulärer Substanzen durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3.

Dünnschichtchromatographie-Analyse von Ethylacetat-Extraktionen der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Ethylacetat-Extraktion der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 per HPLC analysiert, um zu überprüfen, ob die *Pseudomonas*-Stämme die Antibiotika DAPG, PCA oder PLT produzieren. Die Proben enthielten zwar keine der oben genannten Antibiotika (siehe 3.10), allerdings Komponenten unbekannter Natur. Um diese besser charakterisieren zu können, wurde die Ethylacetat-Extraktion sowie die wässrige niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 nach Ethylacetat-Extraktion in der SpeedVac ankonzentriert und mit diesen Proben ebenfalls eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

Auch wenn eine Auftrennung der Probe in einzelne Spots weniger effektiv war als nach einer Vorauftrennung durch Gelfiltration, konnte deutlich gezeigt werden, dass nach Ethylacetatextraktion sowohl bei *P. fluorescens* A506 als auch Bk3 jeweils der oberste violette Spot von Peak 2 fehlte. Die Ethylacetatfraktion beinhaltete hingegen genau diese Spots, wobei die *P. fluorescens* A506-Probe zwei violette Spots aufwies, die *P. fluorescens* Bk3-Probe einen violetten Spot (Abb. 3.11.2.4).

Der RF-Wert des oberen Spots von *P. fluorescens* A506 betrug 0,89 und damit nahezu dem RF-Wert des obersten Spots von Peak 2 der *P. fluorescens* A506-Proben aus der Gelfiltration, sowie dem Salizylsäure-Standard. Der violette Spot von *P. fluorescens* Bk3 hatte einen RF-Wert von 0,85, welcher etwa dem obersten Spot von Peak 2 der *P. fluorescens* Bk3-Proben aus der Gelfiltration entsprach.

Die RF-Werte der einzelnen Spots sowie ihre Fluoreszenz-Farbe unter UV-Licht sind in Tabelle 3.11.2.1 am Ende dieses Kapitels aufgeführt.

Kontrollen zeigten, dass sich Salizylsäure sehr gut in Ethylacetat löst; zudem war eine Salizylsäure-Extraktion aus einer 1%igen angesäuerten wässrigen Standardlösung mit Ethylacetat möglich, was durch eine Dünnschichtchromatographie belegt werden konnte (keine Abbildungen gezeigt).

Es ist davon auszugehen, dass es sich bei dem oberen Spot aus der Ethylacetatextraktion der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 wiederum um Salizylsäure handelt und diese zumindest eine der zuvor unbekannten Substanzen war, die per HPLC detektiert wurden.

Das HPLC-Chromatogramm der Proben aus der Ethylacetatextraktion von *P. fluorescens* Bk3 unterscheidet sich hingegen deutlich von dem von *P. fluorescens* A506. Daher ist es möglich, dass es sich bei der durch Ethylacetat extrahierten Substanz aus der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* Bk3 nicht um Salizylsäure handelt.

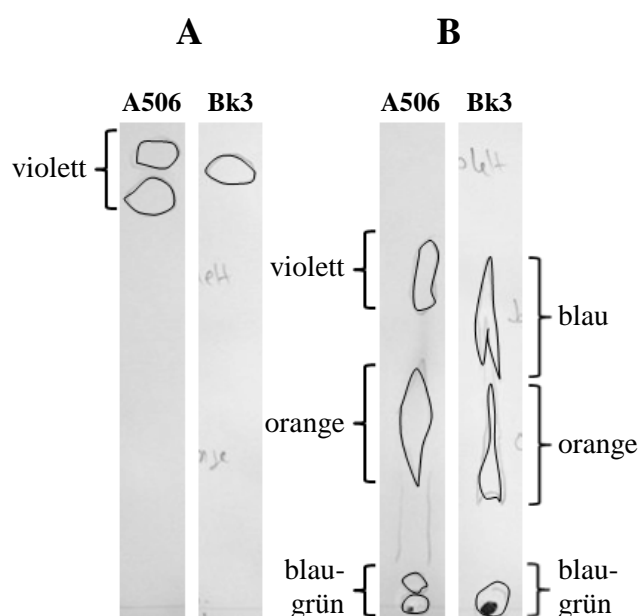


Abb. 3.11.2.4 DC der Ethylacetatextraktionen aus den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. **A** Färbung der Spots aus der Ethylacetatfraktion von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 unter UV-Licht (312 nm). **B** Färbung der Spots aus der niedermolekularen wässrigen Fraktion nach Ethylacetat-Extraktion von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 unter UV-Licht (312 nm). Die niedermolekularen Fraktionen stammten von Kulturen *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose angezogen worden waren. Von jeder Probe wurden 7 µl aufgetragen. Die DC wurde mit Polygram® SIL G UV₂₅₄ Platten und 70% Ethanol durchgeführt.

Tabellarische Darstellung der Dünnschichtchromatographie-Ergebnisse

Tabelle 3.11.2.1 fasst die ermittelten RF-Werte, Fluoreszenzfärbungen bei 312 nm sowie Ninhydrin- und Eisen-Reagenz-Färbungen vergleichend zusammen. Aufgeführt sind hier Proben von Peak 1 und Peak 2 aus der Gelfiltration (siehe 3.11.1), bei denen die niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 aus Kulturen gewonnen worden ist, für die die Bakterien in M9-Medium in Gegenwart und Abwesenheit von 0,2 mM FeCl₃ angezogen worden waren.

Zusätzlich beinhaltet die Tabelle die RF-Werte der Spots, die nach Ethylacetatextraktion aus der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in der organischen und wässrigen Phase vorlagen.

Tab. 3.11.2.1 Zusammenfassung und Auswertung der Dünnschichtchromatographien. Die Fluoreszenzfärbung der Spots wurde mittels UV-Licht (312 nm) detektiert. Die Färbungen wurden mit Ninhydrin zur Detektion primärer und sekundärer Amine und mit Eisen-Reagenz zur Detektion von Salizylsäure durchgeführt. + = positive Färbung, - = keine Färbung, +/- = schwache Färbung. Die Proben für die DC stammen aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen von Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose, sowie optional mit 0,2 mM FeCl₃ angezogen worden waren. Zusätzlich sind die RF-Werte der DC-Proben aus der Ethylacetatextraktion aufgeführt.

| | <u>P. fluorescens A506 Peak 1</u> | | | | | | <u>P. fluorescens Bk3 Peak 1</u> | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------|--------|---------------------|-----|-----|----------------------------------|-----------|--------|---------------------|-----|-----|
| | | | | + FeCl ₃ | | | | | | + FeCl ₃ | | |
| Spot | #1 | #2 | #3 | #1 | #2 | #3 | #1 | #2 | #3 | #1 | #2 | #3 |
| RF-Wert | 0,02 | 0,13 | 0,34 | --- | --- | --- | 0,02 | 0,08 | 0,24 | --- | --- | --- |
| Fluoreszenzfärbung | blau-grün | blau-grün | orange | --- | --- | --- | blau-grün | blau-grün | orange | --- | --- | --- |
| Ninhydrin-Färbung | + | + | + | --- | --- | --- | + | + | + | --- | --- | --- |
| Eisen-Reagenz-Färbung | - | - | - | --- | --- | --- | - | - | - | --- | --- | --- |

| | <u>P. fluorescens A506 Peak 2</u> | | | | | | <u>P. fluorescens Bk3 Peak 2</u> | | | | | | Salizylsäure | |
|-----------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------------------|---------|----------------------------------|------|------|---------|---------------------|------|--------------|---------|
| | | | | | + FeCl ₃ | | | | | | + FeCl ₃ | | | |
| Spot | #1 | #2 | #3 | #4 | #1 | #2 | #1 | #2 | #3 | #4 | #1 | #2 | #3 | |
| RF-Wert | 0,73 | 0,79 | 0,87 | 0,90 | 0,66 | 0,79 | 0,56 | 0,66 | 0,74 | 0,88 | 0,45 | 0,49 | 0,63 | 0,90 |
| Fluoreszenzfärbung | orange | violett | violett | violett | violett | violett | orange | blau | blau | violett | orange | blau | blau | violett |
| Ninhydrin-Färbung | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eisen-Reagenz-Färbung | +/- | +/- | +/- | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

| | <u>Ethylacetat-Extraktion P. fluorescens A506</u> | | | | | | <u>Ethylacetat-Extraktion P. fluorescens Bk3</u> | | | |
|--------------------|---------------------------------------------------|---------|----------------|-----------|--------|---------|--------------------------------------------------|-----------|----------------|------|
| | Ethylacetat-Extrakt | | wässrige Phase | | | | Ethylacetat-Extrakt | | wässrige Phase | |
| Spot | #1 | #2 | #1 | #2 | #3 | #4 | #1 | #1 | #2 | #3 |
| RF-Wert | 0,8 | 0,89 | 0,02 | 0,06 | 0,37 | 0,65 | 0,85 | 0,02 | 0,28 | 0,6 |
| Fluoreszenzfärbung | violett | violett | blau-grün | blau-grün | Orange | Violett | violett | blau-grün | orange | blau |

3.11.3 Massenspektrometrie von Peak 1 und Peak 2 der Gelfiltration von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Die Fraktionen Peak 1 und Peak 2 aus der Gelfiltration von den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (siehe 3.11.1) wurden mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Messung erfolgte wie unter 2.26 beschrieben.

In Peak 1 der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 konnten drei Hauptpeaks und drei Nebenpeaks detektiert werden. Mit Berücksichtigung der natürlichen Isotopenverteilung (C^{12} , C^{13} und C^{14}) konnte ein einfaches Masse- zu Ladungsverhältnis gezeigt werden, d.h. es liegt eine einfache Protonierung der detektierten Substanzen vor. Die in den Abbildungen gezeigten Massenpeaks entsprechen damit also der Masse der Substanz +1. Nach Abzug von 1 ergeben sich damit für die Hauptpeaks gerundet Massen von 259, 497 und 735 m/z (Abb. 3.11.3.1).

Peak 1 von *P. fluorescens* Bk3 gleicht dem von *P. fluorescens* A506. Auch hier konnten drei Haupt- und zwei Nebenpeaks detektiert werden, wobei die Hauptpeaks denen von *P. fluorescens* A506 mit Massen von 260, 498 und 736 m/z sehr ähnlich sind, wenn auch in jeden Massenpeak 1 m/z mehr gemessen wurde (Abb. 3.11.3.1).

In Peak 2 von *P. fluorescens* A506 konnten drei Haupt- und mehrere kleinere Peaks mittels MS detektiert werden. Wieder wurde nur eine einfache Protonierung der detektierten Substanzen festgestellt und es konnten Massen für die Hauptpeaks von 326, 350 und 366 m/z ermittelt werden (Abb. 3.11.3.2).

Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3 ähnelt nur geringfügig dem von *P. fluorescens* A506. Zwar konnte auch hier ein Hauptpeak mit einer Masse von 325 m/z gezeigt werden (bei *P. fluorescens* A506 326 m/z), ansonsten wurden neben mehreren kleineren Peaks zwei weitere Hauptpeaks mit Werten von 225 und 329 m/z detektiert (Abb. 3.11.3.2). Insgesamt konnte für diese Probe nur eine eher geringe Teilchenzahl von $5,9 \times 10^4$ gemessen werden, so dass es sich bei kleineren Nebenpeaks möglicherweise nur um einen Hintergrund oder Verschmutzungen handelt.

Mittels Dünnschichtchromatographie-Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass Peak 2 von *P. fluorescens* A506 Salizylsäure beinhaltet, während für *P. fluorescens* Bk3 diese nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (siehe 3.11.2). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde ein Salizylsäurestandard (1% in Ethanol) mittels MS untersucht und die Ergebnisse mit denen von Peak 2 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 verglichen. Da die Hauptpeaks des Standards zwischen 320 und 350 m/z lagen, wurde insbesondere dieser Bereich von Peak 2 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gesondert betrachtet.

Die MS des Salizylsäure-Standards zeigte in diesem Bereich bei einfacher Protonierung Massenpeaks von 325, 327 und 329 m/z. Für *P. fluorescens* A506 konnten Peaks mit Massen

von 324, 326 und 328 m/z detektiert werden; bei *P. fluorescens* Bk3 wurden Peaks mit Massen von 325, 327 und 329 m/z gezeigt (Abb. 3.11.3.3).

Das für den Standard gezeigte Muster ist demnach in der MS von Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3 wiederzufinden, bei *P. fluorescens* A506 lediglich mit jeweils 1 m/z mehr Masse. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass Peak 2 von *P. fluorescens* A506 tatsächlich Salizylsäure enthält (wie schon mittels Dünnschichtchromatographie gezeigt wurde), zusätzlich ebenso Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 produzieren teilweise, nachweislich durch Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie, gleiche oder ähnliche extrazellulär vorliegende niedermolekulare Substanzen. Eine dieser Substanzen konnte im Vergleich zu einem Standard als Salizylsäure identifiziert werden. Zusätzlich konnten für beide Stämme niedermolekulare Substanzen in Peak 2 detektiert werden, die bei dem jeweils anderen Stamm nicht vorlagen.

Alle ermittelten Werte von Peak 1 und Peak sind noch einmal vergleichend in Tabelle 3.11.3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.11.3.1 Massenpeaks aus der MS von Peak 1 und Peak 2 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie dem Salizylsäurestandard (1% in 96% Ethanol). Die Wachstumsüberstände stammten von einer 3-tägigen Anzucht der Bakterien in 30 mL M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose. Die Gelfiltration fand mittels einer Sephadex G25-Säule und Wasser als Laufmittel statt. Die Peaks wurden aufgefangen, auf 150 µl eingengt und alle Proben 1:1 mit 100% Methanol (mit 2% Essigsäure) versetzt. Der Probenauftrag auf die MS betrug 5 µl/min, mit einer Ionisierungsenergie von 4,5 kV und einer Kapillartemperatur von 200°C. Die Messung erfolgte im positiven Modus. Übereinstimmungen der Peaks in Bezug auf die ermittelte Masse wurden durch graue Unterlegung gekennzeichnet.

| | Hauptpeaks/Masse [m/z] | | | Nebenpeaks/Masse [m/z] | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|-----|-----|---------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Bereich 100-1000 [m/z] | | | | | | | | |
| Peak 1 <i>P. fluorescens</i> A506 | 259 | 497 | 735 | 237 | 519 | 757 | | |
| Peak 1 <i>P. fluorescens</i> Bk3 | 260 | 498 | 736 | 130 | 260 | | | |
| Peak 2 <i>P. fluorescens</i> A506 | 326 | 350 | 366 | 219 | 248 | 680 | 696 | 734 |
| Peak 2 <i>P. fluorescens</i> Bk3 | 225 | 325 | 329 | 212 | 249 | 329 | 389 | 437 |
| Bereich 320-350 [m/z] | | | | | | | | |
| Salizylsäure-Standard | 325 | 327 | 329 | | | | | |
| Peak 2 <i>P. fluorescens</i> A506 | 324 | 326 | 328 | | | | | |
| Peak 2 <i>P. fluorescens</i> Bk3 | 325 | 327 | 329 | | | | | |

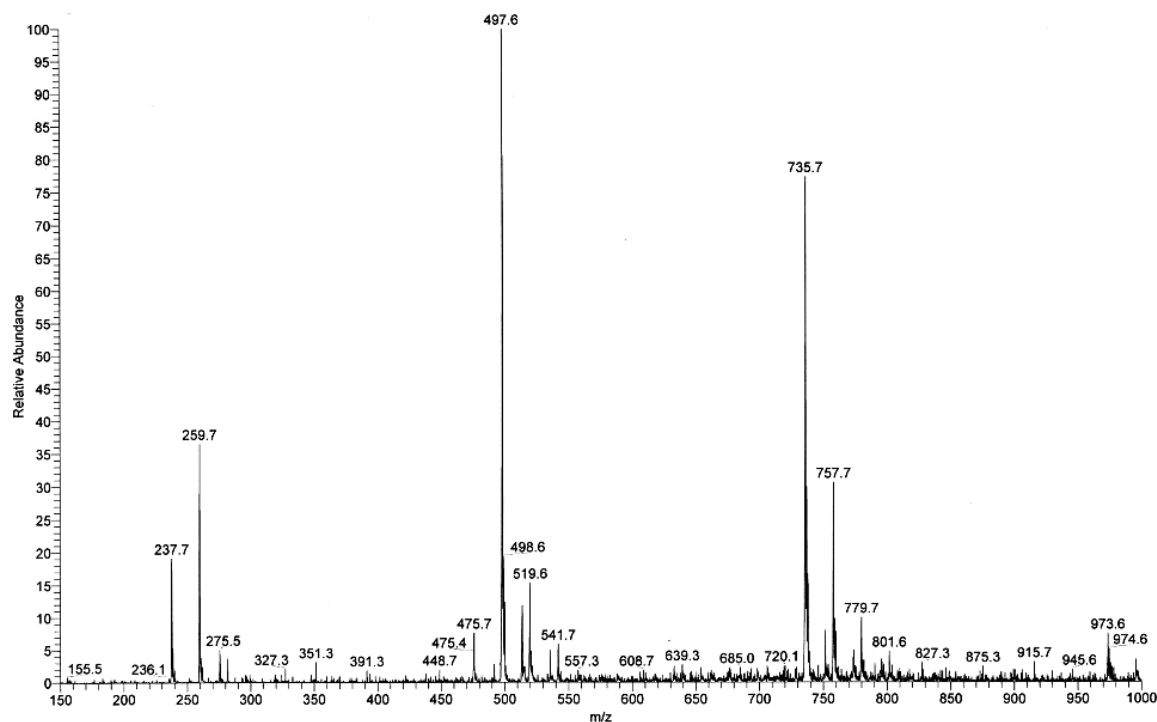
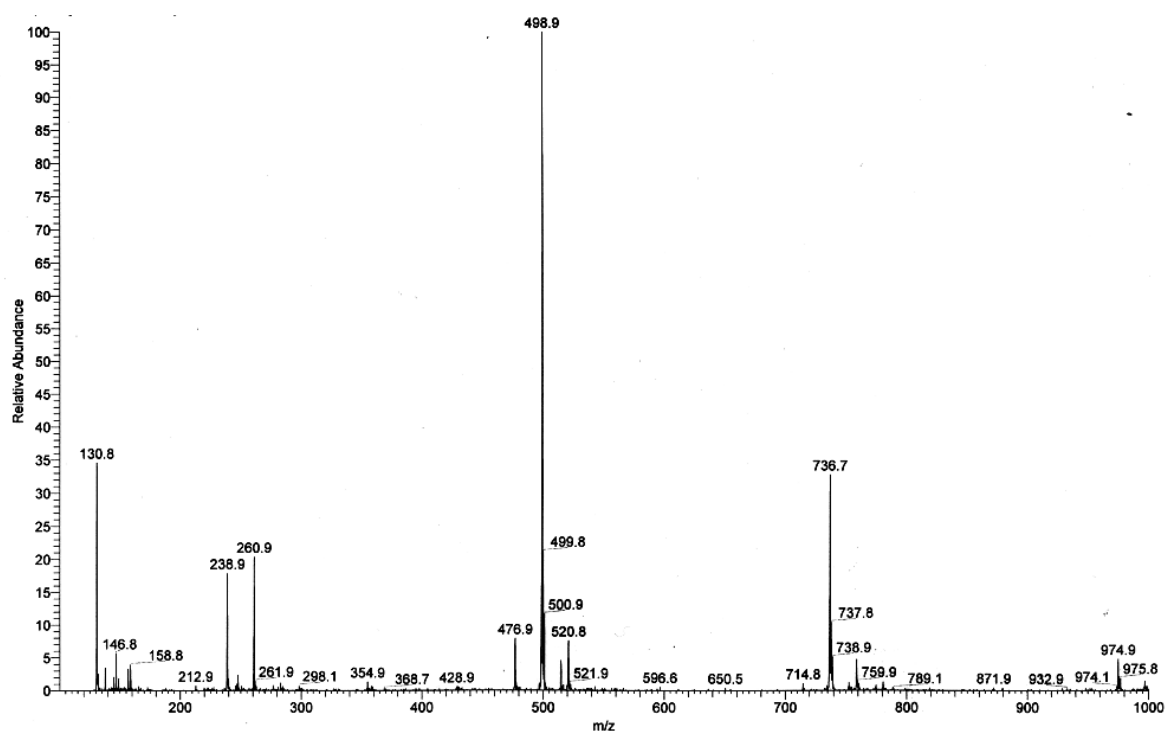
P. fluorescens* A506, Peak 1**P. fluorescens* Bk3, Peak 1**

Abb. 3.11.3.1 Massenspektren von Peak 1 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Es wurden $2,3 \times 10^6$ (A506) bzw. 1×10^5 (Bk3) Teilchen detektiert. Die Wachstumsüberstände stammten von einer 3-tägigen Anzucht der Bakterien in 30 mL M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose. Die Gelfiltration fand mittels einer Sephadex G25-Säule und Wasser als Laufmittel statt. Peak 1 wurde aufgefangen, mittels SpeedVac auf 150 μ l eingengt und 1:1 mit 100% Methanol (mit 2% Essigsäure) versetzt. Der Probenauftrag auf die MS betrug 5 μ l/min, mit einer Ionisierungsenergie von 4,5 kV und einer Kapillartemperatur von 200°C. Die Messung erfolgte im positiven Modus. Der Range wurde auf 150-1000 m/z gesetzt.

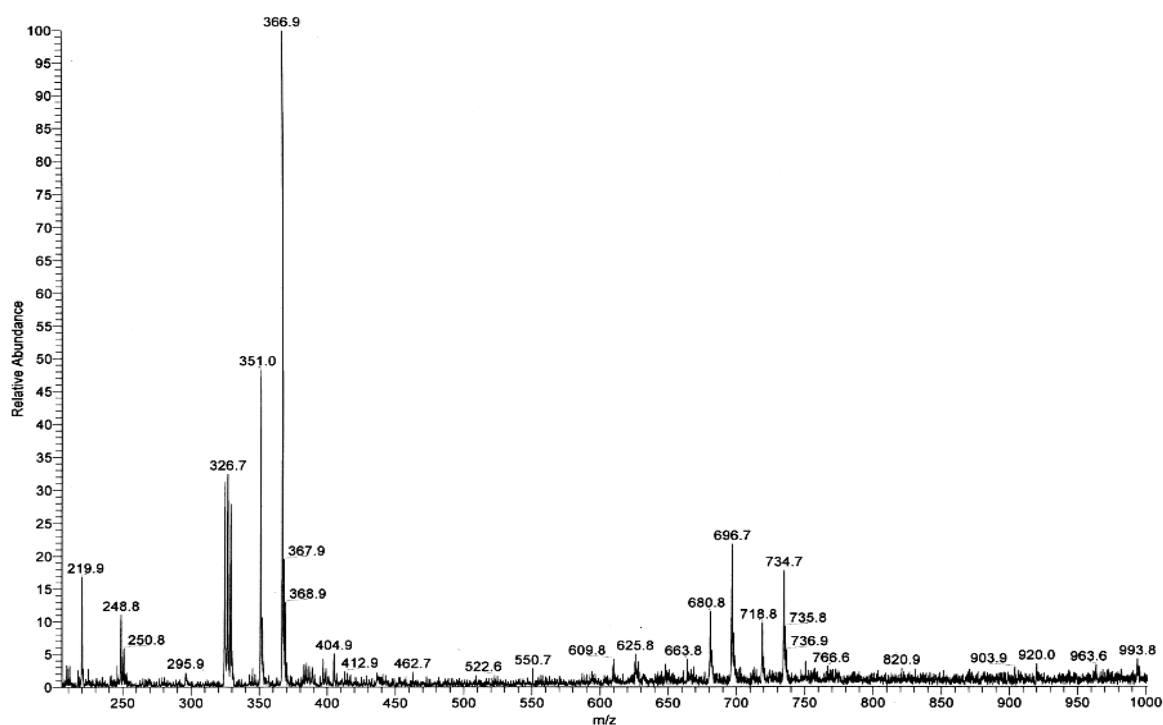
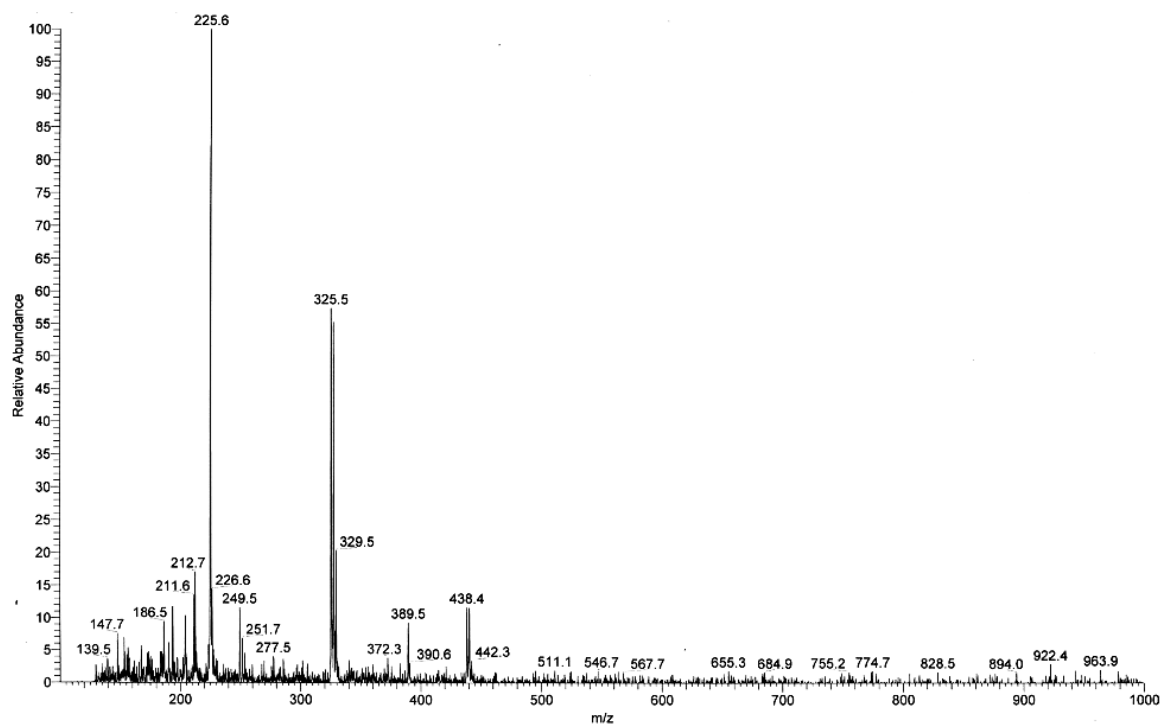
P. fluorescens A506, Peak 2*P. fluorescens* Bk3, Peak 2

Abb. 3.11.3.2 Massenspektren von Peak 2 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 und Bk3. Es wurden $5,3 \times 10^5$ (A506) bzw. $5,9 \times 10^4$ (Bk3) Teilchen detektiert. Die Wachstumsüberstände stammten von einer 3-tägigen Anzucht der Bakterien in 30 mL M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose. Die Gelfiltration fand mittels einer Sephadex G25-Säule und Wasser als Laufmittel statt. Peak 2 wurde aufgefangen, mittels SpeedVac auf 150 μ l eingengt und 1:1 mit 100% Methanol (mit 2% Essigsäure) versetzt. Der Probenauftrag auf die MS betrug 5 μ l/min, mit einer Ionisierungsenergie von 4,5 kV und einer Kapillartemperatur von 200°C. Die Messung erfolgte im positiven Modus. Der Range wurde auf 150-1000 m/z gesetzt.

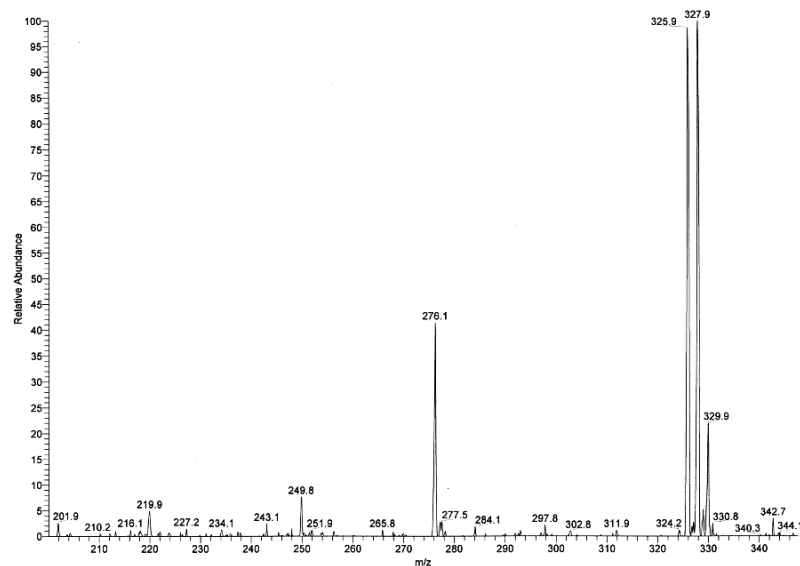
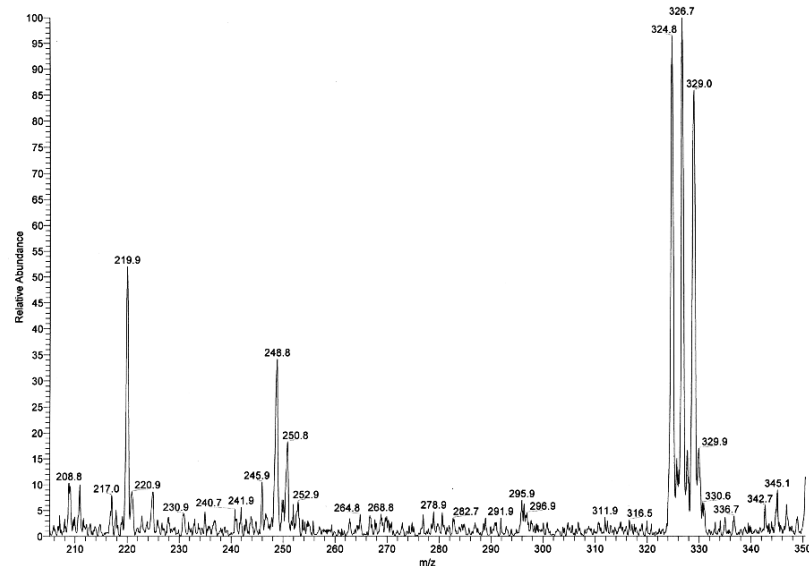
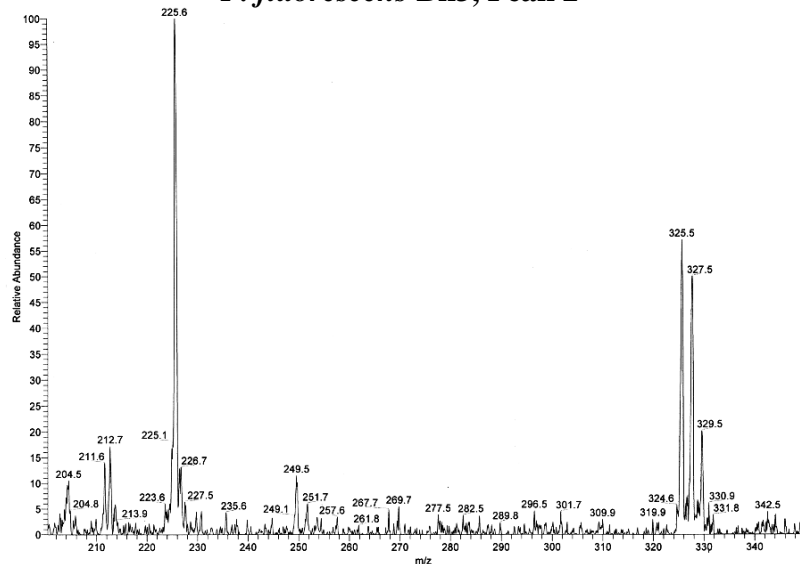
Salizylsäurestandard***P. fluorescens* A506, Peak 2*****P. fluorescens* Bk3, Peak 2**

Abb. 3.11.3.3 Massenspektren des Salizylsäurestandards (1% in 96% Ethanol) und von Peak 2 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Es wurden $1,5 \times 10^4$ (Salizylsäurestandard), $1,7 \times 10^5$ (A506) und $6,9 \times 10^4$ (Bk3) Teilchen detektiert. Die Wachstumsüberstände stammten von einer 3-tägigen Anzucht der Bakterien in 30 mL M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose. Die Gelfiltration fand mittels einer Sephadex G25-Säule und Wasser als Laufmittel statt. Peak 2 wurde aufgefangen, mittels SpeedVac auf 150 μ L eingengt und 1:1 mit 100% Methanol (mit 2% Essigsäure) versetzt. Der Probenaufrag auf die MS betrug 5 μ L/min, mit einer Ionisierungsenergie von 4,5 kV und einer Kapillartemperatur von 200°C. Die Messung erfolgte im positiven Modus. Der Range wurde auf 200-350 m/z gesetzt.

3.11.4 Hemmhoftests in Gegenwart von Fraktionen der Gelfiltration und in Gegenwart von Salizylsäure

Ankonzentrierte niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 wurden mittels Gelfiltration über eine G-25 Säule mit destilliertem Wasser als Laufmittel in zwei Peaks aufgetrennt (siehe 3.11.1), wobei jeder Peak entweder in seiner Gesamtheit oder aber in Fraktionen von 2 Minuten (ca. 3,5 ml) aufgefangen worden ist.

Nach der Gelfiltration wurden mit den einzelnen Fraktionen Hemmhoftests durchgeführt.

Die Hemmhoftests wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt, wobei jeweils 40 µl der Fraktionen aus der Gelfiltration eingesetzt worden sind.

Wurden die Peaks unfractioniert aufgefangen, konnte sowohl für Peak 1 als auch Peak 2 aus der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 die Ausbildung eines Hemmhofes beobachtet werden. Gleiches konnte für Peak 1 aus der niedermolekularen Fraktion von *P. fluorescens* Bk3 gezeigt werden, allerdings nicht für Peak 2 (Abb. 3.11.4.1).

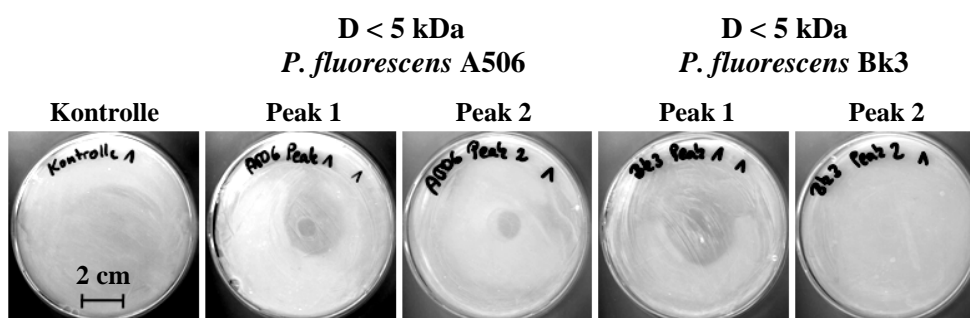


Abb. 3.11.4.1 Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit Peak 1 und 2 aus der Gelfiltration von den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$ in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet wurden jeweils 40 µl der aufgefangenen Peak-Fractionen. Kontrolle ohne Gelfiltrations-Fractionen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die niedermolekulare Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 mindestens zwei oder mehr verschiedene Komponenten enthält, die *E. amylovora* 222::TnluxCDABE hemmen können und die sich bei einer Gelfiltration unter den gewählten Bedingungen in zwei Fraktionen auftrennen lassen.

Dahingegen lassen die Ergebnisse mutmaßen, dass nur Peak 1 der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* Bk3 Komponenten enthält, die *E. amylovora* 222::TnluxCDABE hemmt, nicht aber Peak 2.

Weiterführende Untersuchungen widerlegten diese Ergebnisse allerdings.

Sofern die beiden Peaks aus der die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 noch weiter fraktioniert worden sind, d. h. in 2-Minuten Fraktionen noch weiter separiert und anschließend für Hemmhoftests eingesetzt worden sind, konnte sowohl für Peak 1 als auch Peak 2 beider *P. fluorescens*-Stämme A506 bzw. Bk3 die Ausbildung von Hemmhöfen beobachtet werden (Abb. 3.11.4.2, A und B).

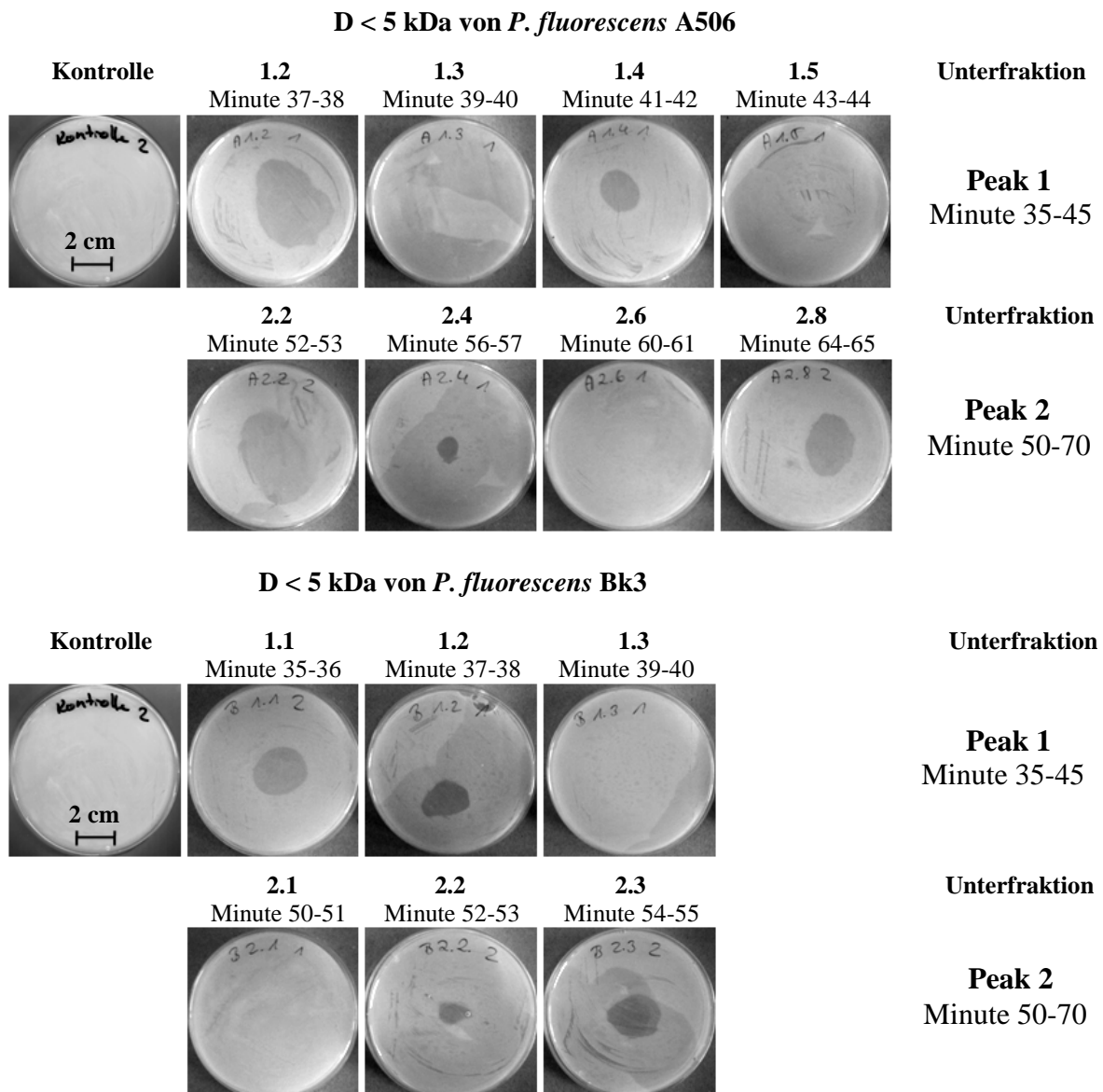


Abb. 3.11.4.2 Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit Unterfraktionen von Peak 1 und 2 aus der Gelfiltration von den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$ in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet wurden jeweils $40 \mu\text{l}$ der aufgefundenen Peak-Fraktionen. Peak 1 wurde zwischen Minute 35 und 45 von der Gelfiltrationssäule eluiert, Peak 2 von Minute 50-70. Die Peaks wurden in 2-Minuten-Fraktionen aufgefangen; die Abbildung zeigt exemplarisch Versuchsansätze mit einigen dieser Unterfraktionen. Kontrolle ohne Gelfiltrations-Fraktionen.

Demnach enthalten beide Peaks niedermolekulare Substanzen, die sich inhibierend auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auswirken. Eine genaue Abtrennung einzelner Komponenten voneinander war allerdings mittels dieser Methode nicht möglich. Aus Abbildung 3.11.4.2, A und B wird deutlich, dass die Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE nicht einer ganz bestimmten Unterfraktion zugeordnet werden konnte, sondern die Ausbildung der Hemmhöfe eher unregelmäßig aufgetreten ist. Zudem ergab die Wiederholung dieser Versuche heterogene Ergebnisse (keine Abbildungen gezeigt). Erklärungen sind in der Aufbereitung der Proben zu suchen; möglicherweise führt die Ankonzentration der

niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mittels SpeedVac oder Gefriertrocknung zu einer teilweisen Inaktivierung inhibitorisch wirksamer Moleküle. Eine zufriedenstellende Lösung dieses Problems konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Im Rahmen der Untersuchung der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände mittels Dünnschichtchromatographie konnte im 2. Peak aus der Gelfiltration von *P. fluorescens* A506-Proben Salizylsäure nachgewiesen werden (siehe 3.11.2 und 3.11.3). Inhibitorische Tests mit einer Konzentrationsreihe von 0-1% Salizylsäurelösung (in Wasser, pH 7,2) sollten klären, ob diese an der Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beteiligt sein kann. Die Hemmhoftests wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt; von jeder Verdünnungsstufe der Salizylsäurelösungen wurden 40 µl eingesetzt.

Bei jeder Verdünnungsstufe konnte nach 24-48 Stunden die Ausbildung eines Hemmhofes, in dem kein Wachstum von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden konnte, gezeigt werden, wobei die Ausprägung des Hemmhofes mit steigender Konzentration an Salizylsäure leicht zunahm (Abb. 3.11.4.3).

Eine Involvierung der von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 produzierten Salizylsäure in die Inhibierung des Feuerbranderreger ist damit wahrscheinlich.

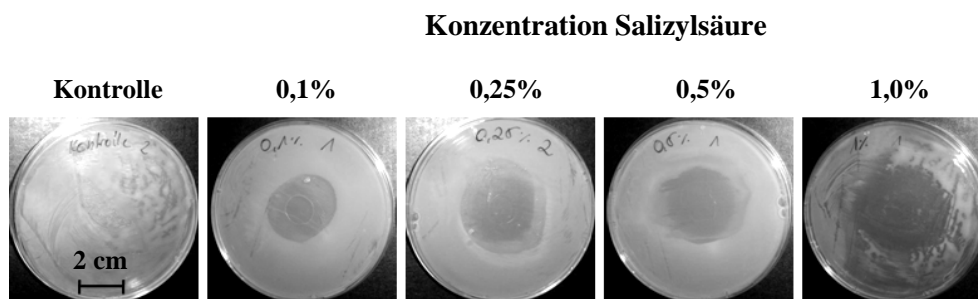


Abb. 3.11.4.3 Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit unterschiedlichen Salizylsäure-Konzentrationen (in Wasser, pH 7,2) nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen (100 µl in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet wurden jeweils 40 µl der einzelnen Konzentrationsstufen an Salizylsäure. Kontrolle ohne Salizylsäure.

Um zu überprüfen, ob die inhibitorische Wirkung von Salizylsäure auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE möglicherweise nicht nur auf deren Funktion als Siderophor zurückzuführen ist, sondern zusätzlich auf eine allgemein antimikrobielle Wirksamkeit, wurden die oben aufgeführten Untersuchungen mit Zitronensäure (in destilliertem Wasser, pH 7,2) in denselben für Salizylsäure verwendeten Konzentrationen wiederholt.

Zitronensäure ist dabei wie Salizylsäure in der Lage, Fe^{3+} als Komplex zu binden. Zitronensäure hat mit 11,3 [FeL] $^{+}/\log\beta$ eine etw. geringere Komplexbildungskonstante als Salizylsäure (16,3 [FeL] $^{+}/\log\beta$) (Šípoš et al., 2008). Es konnte aber keine inhibitorische Wirksamkeit auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE festgestellt werden (keine Abb. gezeigt).

Zusätzlich wurde überprüft, ob die inhibitorische Wirkung von Salizylsäure auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch die zusätzliche Supplementierung des Minimalmediums mit verschiedenen Konzentrationen an FeCl_3 aufgehoben werden kann.

Das Minimalmedium wurde mit $145 \mu\text{M}$ Salizylsäure versetzt (in Wasser, pH 7,2, entspricht der 0,5%igen Lösung) und 0, 29, 72, 145 und $290 \mu\text{M}$ FeCl_3 zugegeben. Die inhibitorischen Tests wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass trotz Zugabe äquimolarer Mengen FeCl_3 die Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch Salizylsäure nicht vollständig aufgehoben werden konnte. Zwar konnte teilweise ein leicht verbessertes Wachstum auf Platten, die mit FeCl_3 supplementiert worden sind, beobachtet werden, trotzdem war das Wachstum in Vergleich zu Kontrollplatten, die nur mit FeCl_3 , aber ohne Salizylsäure versetzt wurden, deutlich schlechter und es konnte die Ausbildung lytischer Zonen gezeigt werden (Abb. 3.11.4.4).

Die Ergebnisse zeigen, dass die inhibitorische Wirkung von Salizylsäure auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE nicht alleine auf die Eigenschaft von Salizylsäure als Siderophor, also als Eisen-rekrutierendes Molekül zurückzuführen sind, sondern hier auch eine allgemein antimikrobielle Eigenschaft eine Rolle spielen muss.

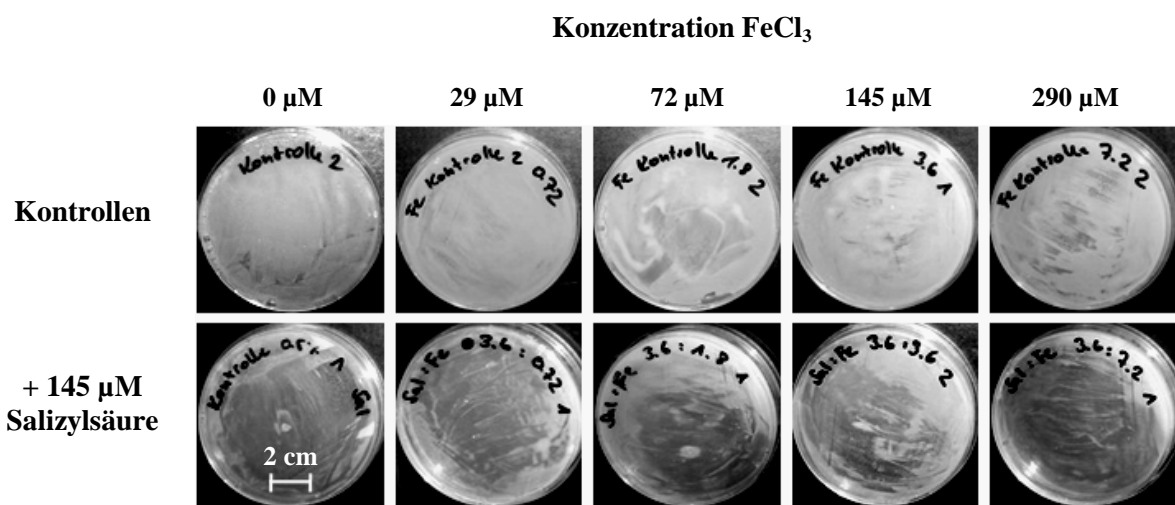


Abb. 3.11.4.4 Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalagar mit unterschiedlichen FeCl_3 -Konzentrationen (in Wasser) nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Platten wurden zusätzlich mit $145 \mu\text{M}$ Salizylsäure (in destilliertem Wasser, pH 7,2) versetzt. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$ in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Kontrollen ohne Salizylsäure, aber mit entsprechenden Konzentrationen an FeCl_3 .

3.12 Infektion von Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE nach Vorbehandlung mit der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Zweige mit Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox wurden mit der zellfreien niedermolekularen Fraktion (<5 kDa) der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 vorbehandelt (ca. 100 µl/Blüte) und anschließend mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (ca. 3×10^7 Zellen/Blüte in LB-Medium) infiziert. Zusätzlich erfolgte die Infektion ohne Vorbehandlung der Blüten.

Insgesamt neun Blüten wurden ausschließlich mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE infiziert. Alle zeigten bereits 24 Stunden nach Infektion eine braun-schwarze Verfärbung des Stempels, die sich bis zum dritten Tag nach der Infektion ausbreitete (Abb. 3.12.1 A). Sieben Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox wurden mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 vorbehandelt. Sechs von ihnen blieben nach Infektion mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE symptomfrei (Abb. 3.12.1 B), nur eine Blüte zeigte die braun-schwarze Verfärbung des Stempels. Von sechs Blüten, die mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* Bk3 vorbehandelt worden waren, blieben fünf nach Infektion mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE symptomfrei (siehe Abb. 3.12.1 C), während eine schwache Symptome mit einem leicht braun verfärbten Stempel zeigte.

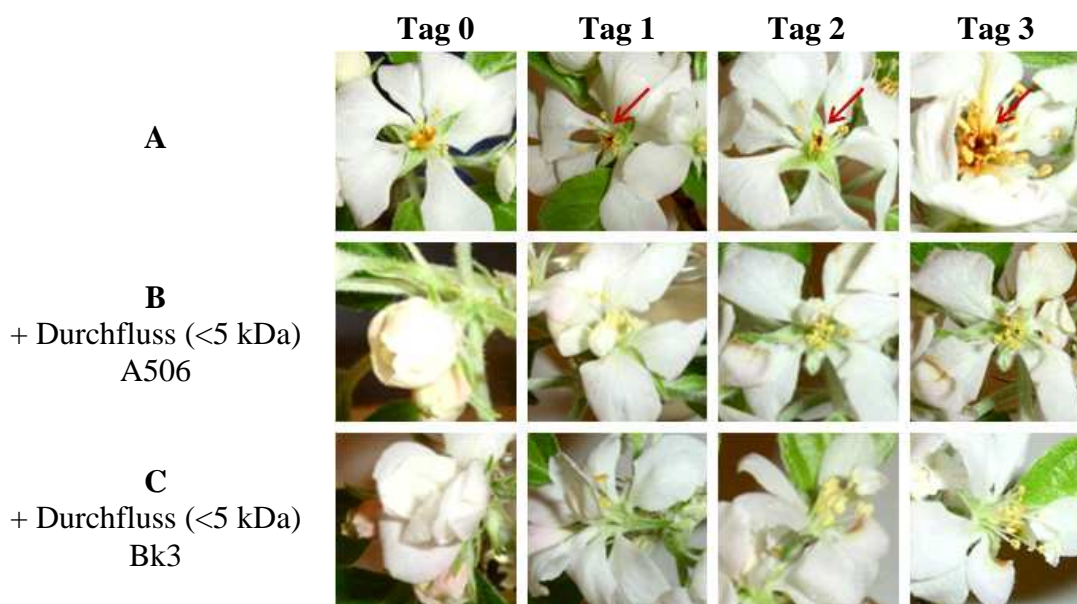


Abb. 3.12.1 Lichtbilder der Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox nach Infektion mit 3×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (in LB-Medium) von Tag 0-3. **A** Keine Vorbehandlung der Blüten. **B** Vorbehandlung der Blüten mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 (100 µl/Blüte). **C** Vorbehandlung der Blüten mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* Bk3 (100 µl/Blüte). Die Anzucht von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zur Gewinnung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose.

Im Gegensatz zu den oben gezeigten Lichtbildern konnte *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mittels Biolumineszenzmessung an allen Versuchstagen auf allen Blüten nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob diese mit der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 vorbehandelt worden waren oder nicht (Abb. 3.12.2 A-C). Die gemessene Biolumineszenz wurde nicht quantifiziert, da sich keine gravierenden Unterschiede in der Intensität der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bei vorbehandelten und nicht vorbehandelten Blüten zeigten.

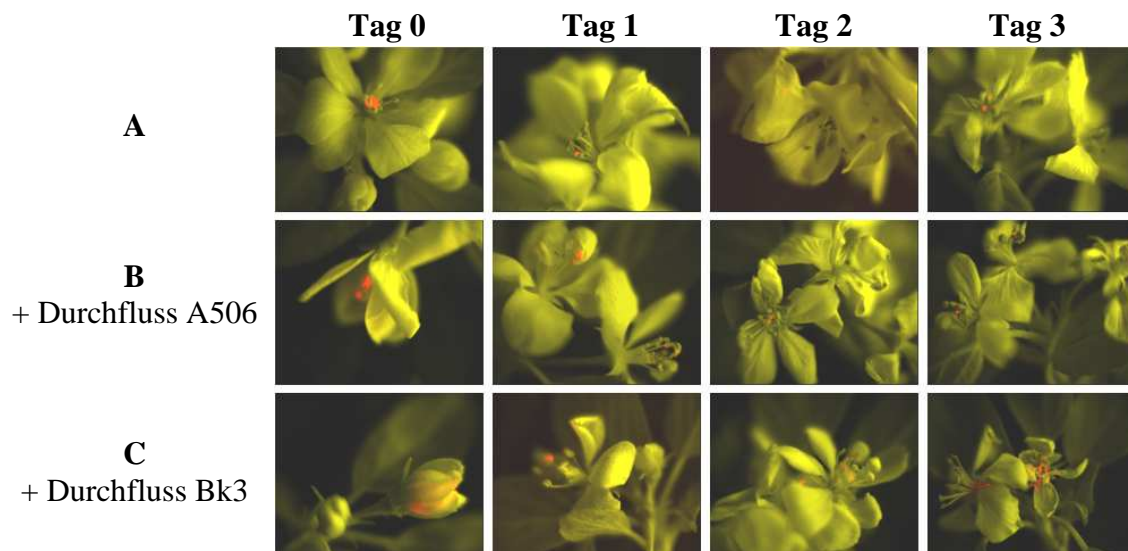


Abb. 3.12.2 Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox von Tag 0-3 nach Infektion mit 3×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (in LB-Medium). **A** Keine Vorbehandlung der Blüten. **B** Vorbehandlung der Blüten mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 (100 μ l/Blüte). **C** Vorbehandlung der Blüten mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* Bk3 (100 μ l/Blüte). Die Anzucht von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zur Gewinnung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose. Jedes Bild besteht aus der Überlagerung des Lichtbildes (gelb, 1 msec, Gain 3, Binning 4 x 4) mit dem Biolumineszenzbild (rot, 10 sec, Gain 3, Binning 4 x 4).

Auf Grund einer zu geringen Anzahl von Blüten, die für diesen Vorversuch zur Verfügung standen, konnte keine detaillierte Auswertung erfolgen, sondern lediglich erste Aussagen getroffen werden. Es wurde gezeigt, dass die hier untersuchten Blüten in Gegenwart der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 eine nahezu fehlende Krankheitssymptomatik im Vergleich zu Blüten, die nur mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE infiziert worden waren, zeigten.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Kontrolle von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch diese niedermolekulare Fraktion möglich ist, auch wenn sie unter Umständen nicht zu einer Inaktivierung des autbiolumineszenten Feuerbranderregers führt, sondern nur verhindert, dass ein Eindringen in die Blüte erfolgt.

4. Diskussion

4.1 Transformation von *P. fluorescens* A506 und Bk3 mit pUTgfpluxAB bzw. *E. amylovora* 222 mit pRL1406 zur Erstellung von biolumineszenten bzw. autobiolumineszenten Zellen

Die Strukturgene der Luciferase konnten erfolgreich mit dem Plasmid pUTgfpluxAB in *P. fluorescens* A506 bzw. *P. fluorescens* Bk3 übertragen und in das Genom der Wirtszellen integriert werden. Durch die Expression der Gene zeigten Transformanten nach Zugabe von einer Endkonzentration von 26 μM n-Decanal eine deutliche meßbare Biolumineszenz mittels CCD-Kamera.

Die Übertragung der Strukturgene der bakteriellen Luziferase von *V. fischeri* in *P. fluorescens* A506 zur Überprüfung des Überlebens des Bakterien in der Phyllosphäre ist durch Cirvilleri und Caldarera (1998) bereits beschrieben worden. Dieses System wurde ebenso von Bogs et al. (1998) genutzt, um biolumineszente *E. amylovora* nach künstlicher Infektion in Pflanzen zu detektieren. Biolumineszente *P. fluorescens* Bk3 wurden bereits von Gau et al. (2002) beschrieben, der mit ihnen die Ausbreitung der Bakterien in der Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox zeigte.

Mit dem Plasmid pRL1406 (beinhaltet das promotorlose *lux*-Operon) konnte das gesamte *lux*-Operon *luxCDABE* erfolgreich auf *E. amylovora* 222 übertragen und in das Genom der Wirtszellen integriert werden. Das Operon muss hinter einen Promotor eines starken und konstitutiv exprimierten Genes integriert werden, damit die Wirtszellen autobiolumineszent sind.

E. amylovora 222::TnluxCDABE zeigte diese Autobiolumineszenz, d. h. die Zellen exprimierten nicht nur die Strukturgene *luxAB* der Luciferase, sondern auch *luxC*, *luxD* und *luxE* und damit die Gene der Enzyme, die das Substrat für die Luciferase bilden. Biolumineszente *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3::TngfpluxAB in Gegenwart von 26 μM n-Decanal und autobiolumineszente *E. amylovora* 222::TnluxCDABE waren von der Intensität ihrer Biolumineszenz her vergleichbar.

Ursprünglich wurde Plasmid pRL1406 verwendet, um autobiolumineszente *Anabaena* sp. zu generieren (Fernández-Pinas und Wolk, 1994). Transformanten zeigten hier eine recht inhomogene und teilweise schwache Intensität der Biolumineszenz, was nach Zugabe von n-Decanal aufgehoben werden konnte (Fernández-Pinas et al., 2000).

Auch die generierten Transformanten von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zeigten eine variable Intensität der Biolumineszenz. Dies liegt darin begründet, dass das mit dem Plasmid pRL1406 auf die Bakterien übertragende *lux*-Operon promotorlos ist und hinter Promotoren des Bakteriums ins Wirtsgenom integriert werden musste, um eine Expression zu ermöglichen. Es ist anzunehmen, dass die den Promotoren nachgeschalteten Gene stärker oder

schwächer exprimiert worden sind und sich dieses in stärkerer bzw. schwächerer Biolumineszenz von *E. amylovora* 222-Transformanden geäußert hat.

Der Transformand mit der stärksten Biolumineszenz wurde isoliert und für weitere Untersuchungen eingesetzt. Eine Verstärkung der Intensität der Biolumineszenz konnte durch Zugabe von n-Decanal aber im Gegensatz zu den *Anabaena*-Transformanden von Fernández-Pinas et al. (2000) nicht bewirkt werden. Dies lässt vermuten, dass das Substrat für die Luziferase in *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in ausreichender Menge in der Zelle vorliegt und nicht mit dem Stoffwechsel der Wirtszelle interferiert. Auch eine Toxizität des Substrates gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, wie es bspw. von Boivin et al. (1988) für *P. fluorescens* sp. RB100C beschrieben worden ist, konnte somit nicht festgestellt werden.

Die Detektion der Biolumineszenz von *P. fluorescens* A506 oder *E. amylovora* Transformanden erfolgte bei Bogs et al. (1998), Cirvilleri und Caldara (1998), Fernández-Pinas et al. (2000) und Fernández-Pinas und Wolk (1994) jeweils durch Auflegen von Röntgenfilmen auf Pflanzen, Schnittpräparaten von Pflanzengeweben oder Agarplatten. Biolumineszenzmessungen mittels Röntgenfilmen haben den großen Nachteil, dass keine nicht-invasiven Echtzeitbeobachtungen der Bakterien auf oder in Pflanzen und auf Agarplatten möglich sind.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Messung mit hoch-sensitiven CCD-Kameras vorgenommen, was eine Messung der Biolumineszenz von Bakterien nicht-invasiv und in Echtzeit erlaubte. Biolumineszenz-Messungen mit CCD-Kameras sind von Gau et al. (2002) für *P. fluorescens* Bk3 sowie von Schmoock (2006) für *E. amylovora* 222 bereits beschrieben worden.

Da die Intensität der Biolumineszenz nicht nur allgemein von der Anwesenheit eines geeigneten Substrates abhängt, sondern auch von einer Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von FMNH₂ durch die Wirtszelle (Meighen, 1991), erlaubte die Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE eine Evaluierung des metabolischen Aktivität von Bakterien, sowie eine Beurteilung darüber, welche Einflüsse sich inhibierend auf den Feuerbranderreger ausgewirkt haben.

4.2 Charakterisierung der inhibitorischen Wirksamkeit von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE

Die inhibitorische Wirksamkeit der Hefestämme *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 wurde mittels Dual Culture Tests auf verschiedenen Medien sowie durch Vorinkubationsversuche des biolumineszenten Feuerbranderreger mit Fraktionen der Wachstumsüberstände der Hefen untersucht.

Dual Culture Tests mit den gewählten Hefestämmen wurden auf zwei gepufferten Medien (PDA, pH 5,6 und NBSP, pH 7,0) sowie einem ungepufferten Medium (NBS, pH 5,8) durchgeführt.

Auf den gepufferten Medien konnte innerhalb von 24 Stunden auch in Gegenwart der Hefen zunächst eine bis zu 2000-fache Zunahme der Biolumineszenz des Pathogens beobachtet werden. Erst danach kam es zu einer Reduktion der Stoffwechselaktivität von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Auch nach 72 bzw. 96 Stunden zeigte *E. amylovora* 222::TnluxCDABE immer noch eine messbare Biolumineszenz in Gegenwart der eingesetzten Hefestämme.

Wurde hingegen ein ungepuffertes Medium eingesetzt (NBS, pH 5,8), so verlief die Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE 2-3 mal schneller als auf gepufferten Medien; zwar nahm sie innerhalb von 24 Stunden zunächst zu, nach 96 Stunden war die Stoffwechselaktivität von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der Hefen aber nahezu vollständig unterdrückt.

Allgemein kann die Aussage getroffen werden, dass *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 zwar eine durch den Einsatz eines biolumineszenten *E. amylovora*-Stammes messbare inhibitorische Wirkung auf den Feuerbranderreger unter *in vitro*-Bedingungen haben, diese im Vergleich zu den untersuchten *P. fluorescens*-Stämmen jedoch verzögert verläuft. Im Gegensatz zum Dual Culture Test mit *P. fluorescens* A506 und Bk3 konnte in den hier durchgeführten Versuchen zunächst eine Zunahme der Biolumineszenz und damit auch ein Wachstum der Bakterien sowie die Zunahme ihrer Stoffwechselaktivität beobachtet werden, bevor ein inhibitorischer Effekt einsetzte.

A. pullulans CF10 und CF40 werden als Pflanzenstärkungsmittel unter dem Namen „Blossom-Protect fb“ von der Firma Bio-Ferm vermarktet, wobei die Formulierung einen Puffer enthält, der den pH auf 4,0 hält. Außerdem sind sowohl *A. pullulans* CF10 als auch CF40 in der Lage, Kulturmedien so anzusäuern, dass ein Wachstum von *E. amylovora* nicht möglich ist (Kunz, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass auf gepufferten Medien die Inhibierung des Feuerbranderregers durch die Hefen deutlich langsamer und weniger effektiv stattfindet als auf dem ungepufferten Medium NBS. Zusätzlich konnte bestätigt werden, dass der pH von NBS als Flüssigkulturmedium durch *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 innerhalb von drei Tagen auf ca. pH 4 abgesenkt wird.

Im Vergleich zu *P. fluorescens* A506 und Bk3 produzierten *A. pullulans* CF10 und CF40, die in M9-Medium mit 2 % Glukose und 10 mM Asparagin angezogen worden waren, eine deutlich geringere Konzentration extrazellulärer Proteine (in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen zwischen 2-8 x weniger) und zeigten auf 1D-Gelen deutlich weniger prägnante Proteinbanden.

Weder für die hochmolekulare noch für die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände der Hefen konnte eine inhibitorische Wirkung auf *E. amylovora*

222::TnluxCDABE festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass der Antagonismus dieser Hefestämme alleine durch eine Ansäuerung von Kulturmedien bewirkt worden ist.

Andererseits zeigte die Arbeit von McCormack et al. (1994) die Anwesenheit inhibitorisch wirksamer Moleküle, die durch die *A. pullulans*-Stämme Y5, Y60 und Y129 produziert werden. Der Charakter dieser Moleküle, die sich inhibitorisch auf *P. fluorescens* und *Staphylococcus aureus* in Bioassays auswirkten, ist aber nicht näher beschrieben worden. Zwar ist bekannt, dass *A. pullulans*-Stämme extrazelluläre Enzyme wie Amylasen, Proteinasen, Lipasen, Zellulasen, Xylanasen und Mannanasen produzieren (Chi et al., 2009), ein möglicher Zusammenhang dieser hydrolytischen Enzyme mit dem Antagonismus der Hefen ist aber nicht geklärt.

Der Wirkmechanismus der Hefen als Antagonisten gegenüber Pathogenen wird aber neben Ansäuerungsprozessen eher im Bereich der Kompetition um Nährstoffe vermutet (Bencheqroun et al., 2007; Kunz, 2005).

Die Wirksamkeit von Blossom-protect fb bei Einsatz unter Freilandbedingungen sowie ihr Einfluss auf die Wirtspflanzen ist bereits in der Literatur diskutiert worden.

Bei künstlicher Infektion von Blüten mit *E. amylovora*, die mit Blossom-Protect fb vorbehandelt worden waren, konnte eine Reduktion der Symptome um bis zu 93% gezeigt werden (Kunz, 2004). In Feldversuchen konnte hingegen eine Symptomreduktion bis zu 73% beobachtet werden (Kunz und Haug, 2006; Seibold et al., 2005).

Neben der positiven Wirkung der Hefen ist allerdings bei mehrfachem Einsatz von Blossom-Protect fb pro Saison auch eine biotisch bedingte Mehrberostung der Pflanzen beschrieben worden (Pflanzenschutzdienst, Jahresbericht 2006; Fachtagung Bioobstbau, 2009). Hierbei kommt es im Zuge von Besiedlungsprozessen der Pflanze bzw. der Früchte zum einen zu einem Überzug der Pflanzenteile mit einem weißlichen Hefefilm, zum anderen zu einem partiellen Abbau der Cuticula durch hydrolytische Enzyme der antagonistischen Pilze. Die Pflanze ihrerseits reagiert auf den Abbau mit der Einlagerung phenolischer Substanzen sowie der Verkorkung von Gewebe (Lindner, 2008).

4.3 Beurteilung der direkten inhibitorischen Wirksamkeit von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE

Die Beurteilung der inhibitorischen Wirksamkeit der ausgewählten Antagonisten *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE erfolgte durch Dual Culture Tests und Hemmhoftests.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 konnten die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf LB-Agar innerhalb von 48 Stunden nahezu vollständig unterdrücken

(auf 1-2% in Bezug auf die Kontrolle ohne Antagonist), während die Biolumineszenz des Pathogens ohne Anwesenheit eines Antagonisten in derselben Zeit zeitgleich mit dem Wachstum der Bakterien auf der Agarplatte stark zunahm. Unter den gewählten Konditionen der Messung (2 Minuten Belichtungszeit) wurde die full well Kapazität des CCD-Chips überschritten, so dass eine Sättigung desselben auftrat. Aus diesem Grund war die tatsächliche Differenz der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in An- und Abwesenheit von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 weitaus größer, d.h. der biolumineszente Feuerbranderreger wurde noch stärker als berechnet unterdrückt.

Diese Ergebnisse sind bereits von Schmooch (2006) gezeigt worden und konnten hier bestätigt werden. Die Beurteilung der antagonistischen Wirkung von *P. fluorescens*-Stämmen auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE über Messung von Biolumineszenz wurden in derselben Arbeit erstmalig gezeigt.

P. fluorescens A506 wird in den USA als Blight Ban® A506 von der Firma Nufarm gegen Feuerbrand im Obstbau eingesetzt (Johnson und Stockwell, 1998) und kann bei korrekter Anwendung die Gefahr einer Feuerbrandinfektion um bis zu 70% herabsetzen. *P. fluorescens* Bk3 wurde im Vorfeld als direkter Antagonist des mykotischen Pathogens *V. inaequalis* identifiziert (Fiss, 2001; Singh, 2004). Schmooch (2006) konnte zeigen, dass das Bakterium neben der direkten Wirkung auf den Feuerbranderreger im Dual Culture Test zudem in der Lage ist, *E. amylovora* 222 auf sterilen, genetisch identischen Pflanzen (in *in vitro* Tanks) von *M. domestica* Holsteiner Cox zu kontrollieren.

Allgemein ist die inhibitorische Wirksamkeit von *P. fluorescens*-Stämmen auf phytopathogene Pilze und Bakterien in der Literatur bereits häufig beschrieben worden.

P. fluorescens EPS62e kann beispielsweise sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (auf Pflanzen) das Wachstum von *E. amylovora* signifikant inhibieren (Cabrefiga et al., 2007). Andere *P. fluorescens*-Stämme zeigten sich hingegen als effektive Antagonisten gegenüber pilzlichen Phytopathogenen wie *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* sowie *Pseudocercospora herpotrichoides* (Clarkson und Lucas, 1997; Nagarajkumar et al., 2004; Upadhyay und Srivastava, 2008).

Im Rahmen von Hemmhoftests auf Minimalmedium kam es durch beide untersuchten *P. fluorescens*-Stämme zu einer ausgeprägten Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE sowie die Ausbildung einer lytischen Zone um die Kolonien der Antagonisten.

Neben einer Unterdrückung des Feuerbrandregers in direktem Zellkontakt mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf LB-Medium geben diese Antagonisten also zusätzlich Substanzen in das Kulturmedium ab, die unter den gewählten Kulturbedingungen in der Lage waren, die Stoffwechselaktivität und das Wachstum des Feuerbrandregers zu unterdrücken. Eine möglicherweise lytische Wirkung auf die Zellen von *E. amylovora* 222 ist dabei nicht

auszuschließen. Der Effekt der Hemmhofbildung war nur unter für *E. amylovora* minimalen Wachstumsbedingungen zu beobachten, aber nicht auf einem Vollmedium wie LB. Hierbei ist zu vermuten, dass die bessere Versorgung mit Nährstoffen oder Mikroelementen in einer höheren Widerstandskraft des Feuerbranderreger gegenüber Hemmstoffen resultiert. Möglicherweise sind die inhibitorisch wirksamen Substanzen einer Nährstoff-entziehenden Natur, was bei Wachstum von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf einem Vollmedium wie LB nicht mehr stark ins Gewicht fällt.

Eine ausschließlich unter minimalen Kulturbedingungen stattfindende Hemmung des Feuerbranderreger durch einen bakteriellen Antagonisten wurde bereits durch Vanneste et al. (1992) und Wodzinski et al. (1987) gezeigt. Die Produktion einer Substanz durch *E. herbicola* Eh252 mit inhibitorischer Wirkung auf *E. amylovora* konnte nur dann gezeigt werden, wenn die Versuche unter minimalen Kulturbedingungen stattgefunden haben, aber nicht auf einem Vollmedium. Die Supplementierung des Minimalmediums mit Casaminosäuren (Aminosäuren, die durch die Hydrolyse von Casein gewonnen werden) oder Histidin führte hingegen zu einem Verlust der Inhibierung. Diese Ergebnisse lassen mutmaßen, dass die Produktion der inhibitorisch wirksamen Substanzen entweder in Gegenwart bestimmter Aminosäuren unterdrückt werden kann, der Feuerbranderreger durch verbesserte Wachstumskonditionen die hemmende Wirkung überwinden kann oder aber die inhibitorisch wirksame Substanz zwar noch produziert wird, aber möglicherweise durch die Aminosäuren in irgendeiner Form gebunden und damit inaktiviert wird.

Ebenso ist die Entwicklung von Hemmhöfen in Dual Culture Tests mit Pathogenen und antagonistischen Stämmen gut beschrieben.

Der *P. agglomerans* Stamm EH318 z. B. setzt beispielsweise zwei Antibiotika (Pantocin A und B) frei, die zu einer doppelten Inhibierungszone bei *E. amylovora* 273 führen (Wright et al., 2001). *P. fluorescens* PTB9 setzt ein Antibiotikum (DAPG) frei, das auf Agarplatten zu einer Hemmhofbildung des Reispflanzen-befallenden Bakteriums *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, führt (Velusamy und Gnanamanickam, 2003). Auch wenn für *P. fluorescens* A506 ursprünglich angenommen wurde, dass es den Feuerbranderreger allein durch Konkurrenz um wachstumslimitierende Nährstoffe inhibiert (Johnson und Stockwell, 1998), so konnte von Temple et al. (2004) gezeigt werden, dass dieser Antagonist ab einer Konzentration von 0,1 mM FeCl₃ eine extrazelluläre Komponente produziert, die *E. amylovora* 153 im Dual Culture Test hemmt. Bis 1 mM FeCl₃ konnte hier eine Zunahme der Produktion der antibiotischen Substanz gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings eher ein Verlust der inhibitorischen Aktivität von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ beobachtet.

Im Rahmen dieser Arbeit führte die Supplementierung des verwendeten Minimalagars mit 0,2 mM FeCl₃ also zu einer deutlichen Reduktion der Hemmhofbildung durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Zwar konnte noch immer eine lytische Zone beobachtet werden, in der *E.*

amylovora 222::TnluxCDABE nicht angewachsen war, allerdings viel diese Zone sowohl bei Einsatz von *P. fluorescens* A506 als auch Bk3 ca. 6-10 mal kleiner aus als bei Minimalmedium, dem kein FeCl₃ zugesetzt worden ist.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass unter Eisen-supplementierenden Bedingungen die Produktion zumindest einer Substanz unterdrückt wurde, die von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 produziert wird und die einen inhibitorischen Einfluss auf *E. amylovora* hat.

Mögliche Komponenten wären hier im Bereich von Siderophoren zu suchen, die durch *P. fluorescens*-Stämme unter Eisenmangelbedingungen sekretiert, deren Produktion bei Eisen-Supplementierung (zwischen 0,1-0,3 mM FeCl₃ im Kulturmedium) allerdings unterdrückt wird (Joyner und Lindow, 2000; Meyer und Stinzi, 1998; Rachid und Ahmed, 2005).

4.4 Mutagenese von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit dem Vektor pUT und Charakterisierung der Mutanten

Um nach Möglichkeit Gene von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 identifizieren zu können, deren Produkte direkt oder indirekt in den Antagonismus gegenüber dem Feuerbranderreger involviert sind, wurde mit beiden Stämmen eine Transposon-vermittelte Mutagenese durchgeführt, bei der per Zufallsprinzip Gene unterbrochen werden. Die daraus resultierenden Mutanten wurden auf eine reduzierte inhibitorische Aktivität gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE hin gescreent. Mutanten, die nur noch eine eingeschränkte Hemmung des biolumineszenten Feuerbranderregers zeigten, wurden näher untersucht und charakterisiert.

4.4.1 Screening und Charakterisierung der generierten Mutanten in Dual Culture- und Hemmhoftests

Erste Untersuchungen durch Dual Culture Tests auf LB-Medium zeigten, dass der Wildtyp von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 innerhalb von 48 Stunden die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE komplett unterdrücken kann.

Mutanten wurden aus diesem Grund ebenfalls auf LB-Medium gescreent. Insgesamt konnten für *P. fluorescens* A506 sechs Mutanten detektiert werden, die im Vergleich zum Wildtyp *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bis zu 72% geringer gehemmt haben. Für *P. fluorescens* Bk3 wurden fünf Mutanten mit einer bis zu 144% verminderten Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Vergleich zum Wildtyp festgestellt.

Als Mutanten mit der am eindeutigsten herabgesetzten Hemmung stellten sich *P. fluorescens* A506 #8-42 und *P. fluorescens* Bk3 #16-22 heraus.

Bei Hemmhoftests auf Minimalmedium, die erst im späteren Verlauf der Arbeiten durchgeführt worden sind, konnte hingegen für alle Mutanten, sowohl von *P. fluorescens* A506 als auch Bk3, eine Ausbildung von Hemmhöfen, in denen kein Wachstum von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden konnte, gezeigt werden. Diese Ergebnisse

zeigen klar auf, dass verschiedene Wirkmechanismen bei der Hemmung von *E. amylovora* durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 eine Rolle spielen müssen. Die Mutanten scheinen durch die Integration des Transposons ins Genom in ihrer antagonistischen Wirkung zwar beeinträchtigt zu sein, so dass diese durch den biolumineszenten Feuerbranderreger auf einem voll supplementierenden Medium wie LB teilweise überwunden werden kann. Unter reduzierten Wachstumsbedingungen wird aber deutlich, dass die Mutanten noch Komponenten sekretieren, die inhibitorisch auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wirken.

Transposon-Mutagenesen wurden bereits häufig eingesetzt, um über Inaktivierung von Genen und einen veränderten Phänotyp des Organismus letztlich das korrespondierende Gen identifizieren zu können.

Beispielsweise beschreiben Wagner et al. (2007) die Tn10-vermittelte Mutagenese von *Legionella pneumophila*, um Gene zu identifizieren, die in die Lipopolysaccharid-Produktion involviert sind. Lin et al. (2008) berichten über die Tn5-vermittelte Mutagenese von *Ralstonia solanacearum*, um Virulenz-Gene dieses Bakteriums zu identifizieren, die zu Krankheitssymptomen auf Tomaten oder *Arabidopsis* führen.

Genauso wurden Transposon-vermittelte Mutagenesen bereits eingesetzt, um Mutanten von bakteriellen oder pilzlichen Antagonisten zu generieren, die ihre inhibitorische Wirkung gegenüber Pflanzenpathogenen verloren haben, und um die korrespondierenden Gene zu identifizieren. So konnte zum Beispiel eine Transposon-Mutante von *P. fluorescens* AU63 isoliert werden, die keine antifungale Aktivität mehr gegenüber dem phytopathogenen Pilz *Phytophthora ultimum* hatte und die eine antimikrobielle Substanz unbekannter Natur nicht mehr produzierte (Rajendran et al., 1998). Cheng et al. (2002) beschreibt die Mutagenese des pilzlichen Antagonisten *Pseudozyma flocculosa*, der sich inhibitorisch auf verschiedene Mehltau-Pilze auswirkt. Durch die Mutagenese konnte eine Mutante generiert werden, die Flocculosin, ein Glykolipid, nicht mehr produzierte und zu welchem ein direkter Zusammenhang mit dem Antagonismus hergestellt werden konnte.

Wijerathne und De Costa (2007) nutzten Insertionsmutagenesen, um Mutanten des Bakteriums *Burkholderia spinosa* zu generieren, welche die inhibitorische Wirkung gegenüber dem Bananenpflanzen-befallenden Pilz *Colletotrichum musae* verloren haben.

Eine Tn5-vermittelte Mutagenese von *P. fluorescens* A506 und Bk3 zur Identifizierung von Genen, deren Produkte in die Inhibierung des Feuerbrandregers involviert sind, ist bislang nicht beschrieben worden und wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig durchgeführt.

4.4.2 Charakterisierung der generierten Mutanten durch Aufnahme von Wachstumskurven und Analyse der extrazellulären Proteinfraction

Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* A506 unterschieden sich kaum in ihrem Wachstumsverhalten im Vollmedium LB, lediglich Mutante #8-42 (Integrationsort des Transposons: Gen für eine Phosphoglukosamin-Mutase) zeigte ein leicht verzögertes

Wachstumsverhalten (25% geringer nach 10 Stunden, 10% geringer nach 24 Stunden). Alle Stämme befanden sich nach 48 Stunden in der stationären Phase bei einer OD₆₀₀ von 2,6-2,8. Ähnlich verhielten sich die generierten Mutanten von *P. fluorescens* Bk3 im Vergleich zum Wildtyp in LB-Medium; zwar konnte hier teilweise ein verzögertes Anwachsen sowie eine längere exponentielle Wachstumsphase beobachtet werden, aber lediglich Mutante *P. fluorescens* Bk3 #16-22 (Integrationsort des Transposons im Gen für ein Thiamin Biosynthese Protein) zeigte ein um ca. 30% schlechteres Wachstum als der Wildtyp. In dem Minimalmedium M9 mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose konnten deutlichere Unterschiede herausgestellt werden; Mutante *P. fluorescens* A506 #8-42 zeigte kein Wachstum in diesem Medium und Mutante *P. fluorescens* A506 #19-56 zeigte ein bis zu 40% schlechteres Wachstum. Für *P. fluorescens* Bk3 #13-17 und #16-22 wurde ebenfalls eine deutliche Wachstumsverzögerung bis zu 35-75% innerhalb der ersten 24 Stunden beobachtet.

Ausgenommen von Mutante *P. fluorescens* A506 #8-42 konnten alle anderen Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in M9-Medium mit 10 mM Asparagin bzw. mit 5 mM NaNO₃ und 10 mM Asparagin anwachsen.

Interessanterweise zeigten die Mutanten *P. fluorescens* A506 #8-42 und *P. fluorescens* Bk3 #16-22 nicht nur ein stark verzögertes Wachstumsverhalten, sondern im Vergleich zu den Wildtypen auch gleichzeitig die am stärksten eingeschränkte Hemmung von *E. amylovora* 222::TnRL1406 auf LB-Medium im Dual Culture Test. Diese Ergebnisse lassen mutmaßen, dass ein Zusammenhang zwischen Wachstumsverhalten der Antagonisten und Hemmung des Pathogens besteht. Trotzdem muss hierbei berücksichtigt werden, dass *P. fluorescens* A506 #8-42 und *P. fluorescens* Bk3 #16-22 auf Minimalmedium eine vergleichbare Hemmung des Feuerbranderreger wie die Wildtypen zeigten und ebenso Hemmhöfe produzieren konnten. Neben der Wachstumsgeschwindigkeit von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 müssen also zusätzlich extrazelluläre Komponenten eine Rolle bei der Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE spielen.

Die Analyse extrazellulärer Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese zeigte deutlich, dass sowohl bei Mutanten von *P. fluorescens* A506 als auch Bk3 einzelne Proteinspots fehlten oder schwächer vorlagen; andere hingegen schienen stärker exprimiert worden zu sein.

Auch hier nahm Mutante *P. fluorescens* A506 #8-42 eine Sonderstellung ein, da sie trotz Anzucht in LB-Medium nur eine stark reduzierte extrazelluläre Proteinzusammensetzung hatte. Die später folgende Identifizierung des Integrationsortes zeigte, dass bei dieser Mutante das Gen für eine Phosphoglukosamin-Mutase betroffen gewesen ist, und damit ein Enzym nicht mehr gebildet wird, das am Aufbau der bakteriellen Zellwand beteiligt ist.

Mengin-Lecreulx und van Heijenoort (1996) beschreiben eine Mutante von *E. coli*, bei der eine Phosphoglukosamin-Mutase inaktiviert wurde. Das Enzym katalysiert die Umwandlung von Glucosamin-6-Phosphat in Glukosamin-1-Phosphat und ist damit essentiell; Mutanten

zeichnen sich durch langsames Wachstum und in Abwesenheit von Glukosamin-Isomeren durch baldige Lyse der Zellen aus. Hier wäre eine mögliche Erklärung zu finden, warum Mutante *P. fluorescens* A506 #8-42 generell verzögert und in Minimalmedium gar nicht wächst; möglicherweise führte die defekte Zellwand auch mit dazu, dass eine normale Proteinsekretion nicht stattfinden konnte.

Die Mutanten *P. fluorescens* Bk3 #1-15 und #16-22 zeigten ebenso eine starke Einschränkung in der Zusammensetzung ihrer extrazellulären Proteine; #16-22 hatte gleichzeitig im Vergleich zum Wildtyp von allen *P. fluorescens* Bk3-Mutanten die am stärksten reduzierte Fähigkeit der Inhibierung des biolumineszenten Feuerbranderregers.

Bei *P. fluorescens* Bk3 #1-15 lag die Integration des Transposons in einem Gen für die Oligopeptidase A, einem Enzym, das Oligopeptide hydrolysiert. Bei *P. fluorescens* Bk3 #16-22 erfolgte die Mutation im Gen für das Thiamin Biosynthese Protein, welches die Biosynthese wichtiger Coenzyme wie Thiamin oder auch Vitamin B1 katalysiert.

Wird die Thiamin Biosynthese per Mutagenese bei *E. coli* inaktiviert, resultiert das in Mutanten, die Thiamin-auxotroph sind und die trotz Kultivierung in einem Vollmedium eine doppelt so lange Generationszeit im Vergleich zum Wildtyp hatten. Minimalmedien müssen mit Thiamin und Nikotinsäure supplementiert werden, um ein Wachstum zu ermöglichen (Lauhon und Kambampati, 2000). Ähnliches wurde, wie zuvor aufgeführt, auch für Mutante *P. fluorescens* Bk3 #16-22 beobachtet.

Bei anderen Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sind Gene betroffen, deren Produkte bspw. im Citratzyklus, bei der Regulation der Osmolarität oder der Regulation bzw. Expression von Genen eine Rolle spielen. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei keiner der aufgeführten Mutanten Gene extrazellulärer Proteine betroffen waren, sondern Genprodukte, die in allgemeine Stoffwechselprozesse involviert sind.

Dennoch scheint zusätzlich die extrazelluläre Proteinzusammensetzung der Mutanten durch die Mutagenese betroffen zu sein.

Da Gene in Bakteriengenomen in Operons, d.h. mehrere Gene hintereinander geschaltet vorliegen (Madigan und Matinko, 2009), ist es denkbar, dass durch den Integrationsort des Transposons nachfolgende Produktions- oder Sekretionswege betroffen gewesen sind, die zu dem verändert sekretierten Proteinmuster führten. Möglicherweise konnten – bedingt durch die Inaktivierung der Gene durch den Integrationsort des Transposons – andere Gene wiederum auch nicht aktiviert werden.

Thurn und Chatterjee (1985) zeigten zum Beispiel, dass eine einfache Insertionsmutagenese bei *E. chrysanthemi* EC16 sowohl den Export von zellulolytischen als auch pektolytischen Enzymen beeinflusst. Die Tn5-Mutagenese an beliebiger Stelle im *rpf*-Gencluster von *X. campestris* führte zu einem Verlust der Synthese extrazellulärer Enzyme und Polysaccharide (Tang et al., 1991). Watanabe et al. (1997) konnte zeigen, dass eine einfache Integration eines

Tn5-Transposons in das Genom von *Serratia marcescens* 2170 zu einem Verlust der Sekretion von bis zu 4 verschiedenen Chitinasen führte.

Inwieweit diese veränderte Proteinzusammensetzung – zumindest in Dual Culture Tests auf LB-Agar – tatsächlich für die herabgesetzte Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE verantwortlich gewesen ist, verbleibt unklar. Eine Identifizierung der Proteine durch Massenspektrometrie brachte keine signifikanten oder auswertbaren Ergebnisse. Die Ergebnisse der Hemmhoftests mit allen Mutanten zeigten aber, dass trotz verändert sekretierter Proteinzusammensetzung immer noch eine deutliche Hemmung des Feuerbranderreger auf Minimalmedium stattfindet und damit die in der 2D-Gelelektrophorese fehlenden Proteine vermutlich nur eine untergeordnete Rolle in der Hemmung von *E. amylovora* 222 spielen.

4.4.3 Schlussbetrachtung der Mutagenese und der Charakterisierung der Mutanten

Durch die hier durchgeführten sehr aufwendigen Mutagenesen konnten nicht wie erhofft Gene von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 identifiziert werden, die in einem direkten Zusammenhang mit dem Antagonismus gegenüber *E. amylovora* stehen.

Mutanten, die in Dual Culture Tests eine reduzierte Inhibierung von *E. amylovora* 222::TnluxABCDE und teilweise in LB- oder M9-Medium auch ein eingeschränktes Wachstum zeigten, produzierten auf Minimalagar trotzdem ausgeprägte Hemmhöfe. Diese Ergebnisse sagen aus, dass das verminderte Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp sich negativ auf den Antagonismus gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxABCDE auf LB-Agar auswirkt, aber gleichzeitig nicht ausschließlich Wachstumskonkurrenzen für die Inhibierung verantwortlich sind. Zusätzlich müssen extrazelluläre Komponenten unbekannter Natur mit inhibitorischer Wirkung auf den Feuerbranderreger vorliegen, deren Wirksamkeit aber nur auf Minimalagar offensichtlich wird.

Aus diesem Grund wäre es sinnvoll gewesen, die Mutagenese erneut durchzuführen und die Mutanten anschließend nicht auf LB-Agar, sondern dem für *E. amylovora* entwickelten Minimalagar zu screenen. Geeignete Kandidaten für die Identifizierung inhibitorisch wirksamer, extrazellulärer Moleküle wären dann Mutanten, die keine oder stark reduzierte Hemmhöfe auf Minimalagar ausbilden würden. Aus zeitlichen Gründen konnte dieser Teil der Arbeit aber nicht mehr mit den entsprechenden Anpassungen wiederholt werden. Vielmehr wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die extrazellulären, hoch- und niedermolekularen Komponenten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gelegt, die eine deutlich hemmende Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxABCDE gezeigt hatten.

4.5 Wechselwirkungen zwischen *P. fluorescens* A506 und Bk3 sowie *E. amylovora* 222

Um Wechselwirkungen zwischen *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *E. amylovora* 222 besser verstehen zu können, wurden vergleichende Wachstumskurven in Minimal- und Vollmedium aufgenommen. Unter Verwendung biolumineszenter und nicht biolumineszenter *P. fluorescens* und *E. amylovora*-Stämme war es zusätzlich möglich, die Stämme miteinander zu kultivieren und abzuschätzen, ab welchem Zeitpunkt der Co-Kultur sich der Antagonismus von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 inhibierend auf den Stoffwechsel von *E. amylovora* 222 auswirkt.

Vergleichende Proteinsekretionsstudien sollten zeigen, ob *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 möglicherweise auf die Anwesenheit des Feuerbranderreger reagieren können. Hierfür wurden 2D-Gelelektrophoresen der extrazellulären Proteinfraction durchgeführt, bei der die Bakterien in Gegenwart und Abwesenheit von *E. amylovora* 222 angezogen worden waren.

Wurde der Feuerbranderreger alleine in LB-Medium und dem Minimalmedium M9 kultiviert, so zeigte dieser in beiden Medien ein deutlich langsames Wachstumsverhalten als die *P. fluorescens*-Stämme A506 und Bk3. In LB-Medium erreichte *E. amylovora* 222 nach 24 Stunden nur 70%-80% der gemessenen OD₆₀₀ von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. In M9-Medium war dieser Unterschied noch deutlicher feststellbar; hier erreichte *E. amylovora* 222 nach 24 Stunden nur 37-44% der gemessenen OD₆₀₀ von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3.

Bei Co-Kultivierung von biolumineszenten oder nicht-lumineszenten *E. amylovora* 222 mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und gleichzeitiger Biolumineszenzmessung konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu einer Einzelkultur die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart von *P. fluorescens* A506 und Bk3 innerhalb von 10 Stunden von 1×10^5 auf 1×10^3 bzw. 1×10^2 RLUs absank, was dem Hintergrundrauschen und keiner tatsächlich gemessenen Biolumineszenz entspricht.

Interessant war hierbei die Beobachtung, dass der Biolumineszenzverlauf von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE – sowohl bei alleiniger Kultur als auch bei Co-Kultur mit *P. fluorescens* A506 oder Bk3 – während der ersten Stunden parallel verlief. Erst nach vier bis fünf Stunden nahm die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der Antagonistenstämme deutlich ab.

Dieser Effekt könnte darauf zurückzuführen sein, dass möglicherweise erst nach vier bis fünf Stunden Kultivierung eine Aktivierung von Genen bei *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 stattgefunden hat, die in einem direkten oder indirekten Zusammenhang mit der Hemmung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE stehen. Vielleicht wurde aber auch erst nach dieser Zeit eine Zelldichte in der Kultur erreicht, die eine Konkurrenz der Bakterien um Nährstoffe bewirkte, bei der der biolumineszente Feuerbranderreger unterlegen war.

Neben antagonistischen Wirkweisen wie der Produktion von Antibiotika, HCN oder proteolytischen Enzymen durch *P. fluorescens*-Stämme werden indirekte Wirkweisen beschrieben, wie z.B. die Anreicherung von Bakterien in bestimmten physiologischen Nischen, die geschützte Lebensbedingungen bieten und die damit verbundene Konkurrenz um Wachstums-limitierende Ressourcen. Hierbei kann es sich beispielsweise um eine Konkurrenz um Kohlenhydrate handeln, die z.B. im Honigtau von Aphiden, in Exudaten oder in Auswaschungen von Wirtspflanzen vorliegen, sowie um Mikronährstoffe wie Eisen. (Pal und McSpadden Gardener, 2006).

Eine wichtige Rolle könnte dabei die bessere Ausnutzung ähnlicher Kohlenstoffquellen durch den Antagonisten im Vergleich zum Pathogen spielen; Ji und Wilson (2002) zeigten beispielsweise, dass *P. fluorescens* TLP2 eine hohe Übereinstimmung in der Verwendung von Nährstoffen wie Aminosäuren, Zuckern oder organischen Säuren wie das Pathogen *P. syringae* pv. tomato (Tomatenbakteriose) hat und eine Konkurrenz um diese Nährstoffe in einem direkten Zusammenhang mit der biologischen Kontrollkapazität steht.

Für den Antagonisten *P. fluorescens* EPS62e konnte gezeigt werden, dass er zwar keine Antibiotika produziert, aber *E. amylovora* unter *in vitro* Bedingungen kontrollieren kann, da er ein vielfältigeres Spektrum an Nährstoffen als das Pathogen nutzen kann. Hierzu gehören z.B. Saccharose, Malat oder Citrat, die auf der Oberfläche von Blättern/Blüten von Apfel- und Birnenbäumen vorliegen können, aber nur von *P. fluorescens* EPS62e und nicht von *E. amylovora* genutzt werden (Cabrefiga et al., 2007).

Für eine effektive Kontrolle des Feuerbrandregers unter Freilandbedingungen durch Antagonisten ist es zusätzlich besonders wichtig, dass primäre Infektionsorte – also die Blüten – durch den Antagonisten schnell kolonisiert werden können und die Populationsgröße ausreichend groß ist (10^5 - 10^6 Zellen/Blüte) (Johnson und Stockwell, 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die Kontrollkapazität von bspw. *P. fluorescens* A506 am größten war, wenn die Bakterien bereits Populationen von $1,9 \times 10^6$ Zellen/Stempel aufwiesen, bevor eine Infektion mit *E. amylovora* auftrat (Wilson und Lindow, 1993).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten klar, dass *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 unter *in vitro* Bedingungen die Nährstoffe in beiden verwendeten Medien besser nutzten, was zu einem schnelleren Wachstum und einer höheren Zelldichte im Vergleich zum Feuerbrandreger führte. Generell kann bei *E. amylovora*-Stämmen aber in Abhängigkeit von den gewählten Wachstumsbedingungen mit einer deutlich längeren Generationszeit von 80-100 Minuten gerechnet werden als bei *P. fluorescens*-Stämmen (Generationszeit ca. 60-80 Minuten) (Lebert et al., 1998; Miller und Schroth, 1972). Sollten *P. fluorescens* A506 und Bk3 auch unter Freilandbedingungen ein vergleichbares Verhalten zeigen, so könnte dies zu einem Ausschluss des Feuerbrandregers von Nährstoffen auf der Pflanze/Blüte führen und damit einen wichtigen Teil zum Antagonismus beitragen.

Hervorzuheben ist sicherlich, dass beide Antagonisten bereits nach wenigen Stunden zu einer deutlich sichtbaren Hemmung der Stoffwechselaktivität des Pathogens führten, die

antagonistische Wirkung also sehr früh eintrat. Dieser Effekt konnte dank der in dieser Arbeit verwendeten hochsensitiven Methodik über Messung der Biolumineszenz dargestellt werden.

Im Gegensatz zu dieser Methodik wird der *in vitro*-Antagonismus in vielen Fällen eher über die Beobachtung von Hemmhofentwicklungen nach einem oder wenigen Tagen durchgeführt (z.B. Nagarajkumar et al., 2004; Reddy et al., 2008; Vanneste et al., 1992) und nicht beschrieben, ab welchem Zeitpunkt nach Start der Co-Kultur eine Hemmung zu beobachten gewesen ist.

Pusey (1998) untersuchte beispielsweise zwar den Effekt verschiedener Konzentrationen von synthetischem Nektar auf die Hemmung von *E. amylovora* Ea153 bei Co-Kultur mit *P. fluorescens* A506 oder *P. agglomerans* C9-1, die Auswertung der Versuche erfolgte aber frühestens nach 24 Stunden.

Andere Schwerpunkte von Untersuchungen werden auf die Dynamik von Populationen von Pathogen und Antagonisten auf Pflanzen gelegt; eine Re-Isolierung des Feuerbranderregers von Blüten oder anderen Pflanzenteilen und damit eine Überprüfung seines Stoffwechsel- bzw. Überlebensstatus erfolgte aber auch hier erst nach einem bis mehreren Tagen (z.B. Johnson et al., 2004; Lindow et al., 1996)

Zu einer Charakterisierung der Hemmung von *E. amylovora* durch den/die Antagonisten sind Kenntnisse über den zeitlichen Verlauf der Hemmung aber möglicherweise nutzbringend. In diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der OD₆₀₀ ohne Co-Kultur zu dem Zeitpunkt, wo eine Hemmung des Stoffwechsels von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden konnte, bei *P. fluorescens* A506 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE noch parallel verlief, bei *P. fluorescens* Bk3 hingegen ca. 0,3 höher lag als bei *E. amylovora* 222::TnluxCDABE.

Zwar zeigten die *Pseudomonas*-Stämme später eine deutlich höhere OD₆₀₀ als der Feuerbranderreger, die nachweislich so frühe Hemmung könnte aber auf andere Wirkmechanismen hindeuten als auf ein ausschließliches „Überwachsen“ von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Diese Ergebnisse sprechen also für einen additiven Effekt, d.h. dass neben einer Wachstums konkurrenz noch andere Effekte eine Rolle spielen müssen. Wie später gezeigt werden konnte, produzieren *P. fluorescens* A506 und Bk3 zusätzlich zu einem schnelleren Wachstum auch auf den Feuerbranderreger inhibitorisch wirksame hoch- und niedermolekulare Substanzen.

Die Hemmung des Feuerbranderregers zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Co-Kultur lässt vermuten, dass *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 möglicherweise die Anwesenheit von *E. amylovora* 222 detektieren und darauf mit einer veränderten Genexpression reagieren können. Aus diesem Grund wurden vergleichende Proteinsekretionsstudien der extrazellulären Proteinfraction durchgeführt, bei der die Bakterien in Gegenwart und Abwesenheit von *E. amylovora* 222 angezogen worden waren.

Unter beiden Anzuchtskonditionen waren bei anschließender Gelelektrophorese Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zwischen alleiniger Anzucht der Antagonisten bzw. in Gegenwart von *E. amylovora* 222 erkennbar.

Unabhängig von der Supplementierung des M9-Mediums mit 0,5 mM CaCl_2 war in Gegenwart des Feuerbranderregers im Wachstumsüberstand sowohl von *P. fluorescens* A506 als auch Bk3 eine veränderte Proteinsekretion zu beobachten, wobei Proteine herauf- bzw. herunterreguliert vorlagen.

Ohne CaCl_2 -Supplementierung des Mediums lagen allerdings andere Proteine verändert sekretiert vor als in Anwesenheit von 0,5 mM CaCl_2 . Gleichzeitig war die sekretierte Proteinzusammensetzung ohne Supplementierung mit CaCl_2 weniger vielfältig. Es ist wahrscheinlich, dass die Supplementierung des M9-Mediums mit CaCl_2 zu besseren Wachstumsbedingungen für *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 geführt hat, und damit auch zu einer stärkeren Proteinsekretion. Die Ergebnisse lassen zudem vermuten, dass eine Maskierung der tatsächlich durch den Feuerbranderreger beeinflussten Proteine von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 durch eine CaCl_2 -Supplementierung der Kulturmedien stattgefunden hat. Denkbar wäre aber auch, dass eine Aktivierung/Suppression von Genen sowohl durch die Anwesenheit von CaCl_2 als auch *E. amylovora* 222 bedingt gewesen ist.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 reagieren laut der vorliegenden Versuchsergebnisse auf die Gegenwart von *E. amylovora* 222 mit einem verändert sekretierten Proteinmuster. Es ist unwahrscheinlich, dass mit dieser Untersuchungsmethode Proteine von *E. amylovora* 222 erfasst worden sind, da der Feuerbranderreger unter den gewählten Bedingungen zum einen nur eine geringe Konzentration weniger Proteine in den Wachstumsüberstand sekretiert, zum anderen in Co-Kultur mit den *P. fluorescens*-Stämmen nachweislich bereits nach vier bzw. fünf Stunden deutlich in seiner Stoffwechselaktivität gehemmt wird. Die Anzucht der Bakterien für die Proteingele erfolgte aber für drei Tage, so dass zu vermuten ist, dass nur Proteine von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 erfasst worden sind, auch wenn dies im Rahmen dieser Arbeit nicht belegt worden ist.

Eine Analyse der herauf- bzw. herunterregulierten Proteine mittels MALDI-TOF wurde zwar durchgeführt, ergab aber keine eindeutigen Ergebnisse bzw. keine Identifizierung von verändert sekretierten Proteinen.

Offen bleiben damit also die Fragen, welche Faktoren dazu führen, dass *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 die Anwesenheit eines anderen Bakteriums detektieren, welche Proteine verändert sekretiert worden sind und ob sie im Zusammenhang mit dem Antagonismus von *E. amylovora* 222 stehen könnten. Hier könnten als möglicher weiterführender Ansatz Untersuchungen des Transkriptoms von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (angezogen in Gegenwart oder Abwesenheit des Feuerbranderregers) mittels SSH vorgenommen werden, um Gene der Antagonisten zu identifizieren, die in Gegenwart von *E. amylovora* verändert exprimiert werden. Interessant wäre an dieser Stelle ebenso eine Untersuchung, inwieweit sich die extrazelluläre Proteinzusammensetzung bei Co-Kultivierung der *P. fluorescens*-Stämme mit *E. amylovora* 222 im zeitlichen Verlauf verändert, indem man bspw. Proben der

Wachstumsüberstände nach 0, 24, 48 und 72 Stunden gewinnt und anschließend 2D-Gelelektrophoresen durchführt.

Bei Bakterien erfolgt die Detektion von Signalen aus der Umwelt und ein Anpassen der Genexpression an veränderte Umweltbedingungen über Zweikomponentensysteme. Ein Transmembranprotein dient dabei als Rezeptor, der Umweltsignale detektiert und in seiner Funktion als Kinase dieses Signal durch Phosphorylierung eines zytoplasmatischen Regulatorproteins weitergibt. Dieser aktivierte Regulator kann anschließend in die Genexpression eingreifen (Chang und Stewart, 1998).

Signale, die hierbei eine Rolle spielen, sind vielfältiger Natur. Beispielsweise wird die extrazelluläre Konzentration an Magnesium oder Kupfer detektiert und darauf reagiert (Munson et al., 2000; Soncini und Groisman, 1996). Das Zweikomponentensystem VraSR von *S. aureus* reagiert auf Schäden der Zellwand mit einer Hochregulation von Proteinen, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind (Kuroda et al., 2003).

Gut untersucht ist sicherlich auch das Quorum Sensing, wobei eine Regulation der Genexpression als Antwort auf die Zelldichte der Bakterien stattfindet. Bei Gram-negativen Bakterien ist das Signalmolekül (oder der Autoinducer) ein N-Acyl Homoserine Laktone-Derivat, das leicht durch Zellmembranen diffundieren kann (Bassler, 1999; Kleerebezem et al., 1997).

Quorum Sensing ermöglicht einer Population von Bakterien gleicher Spezies, synchron bestimmte Vorgänge auszuführen, die bei Ausführung durch ein einzelnes Individuum nicht ausreichend effektiv wären. Dazu zählen beispielsweise die Ausbildung von Biofilmen, Sporulation, Konjugation oder Pigment-Produktion. Tatsächlich gibt es aber auch Autoinducer wie AI-2, die als Quorum Sensing Signal für die Interaktion zwischen verschiedenen Spezies dienen (Taga und Bassler, 2003).

Die Möglichkeiten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, auf die Anwesenheit von *E. amylovora* 222 zu reagieren, könnten also im Bereich von Quorum Sensing und/oder der Signaltransduktion über ein Zweikomponentensystem liegen. Welche extrazellulären Moleküle von *E. amylovora* 222 in diesem Fall aber möglicherweise von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 detektiert werden und ob die hier beobachtete veränderte Genexpression und/oder Proteinsekretion in den Antagonismus gegenüber dem Feuerbranderreger involviert ist, muss noch genauer untersucht werden.

4.6 Charakterisierung der hochmolekularen Fraktion (>5 kDa) der Wachstumsüberstände und des Periplasmas von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Die von den gewählten Antagonisten sekretierten Proteine in der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände sowie die Proteine des Periplasmas wurden auf eine inhibitorische

Wirksamkeit gegenüber *E. amylovora* 222 untersucht, indem Vorinkubationsversuche mit anschließendem Auftrag der Versuchsansätze auf LB-Agar und Hemmhoftests auf Minimalagar durchgeführt wurden.

Die hochmolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände sowie des Periplasmas wurde zusätzlich mittels 1D und 2D-Gelelektrophorese näher untersucht.

Die inhibitorische Wirksamkeit der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände und des Periplasmas wurde mit Vorinkubationsversuchen mit anschließendem Auftrag der Versuchsansätze auf LB-Agar untersucht. Hemmhoftests unter Einsatz der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände fanden auf Minimalagar statt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Vorinkubation von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 und Bk3 und einem anschließenden Spotten auf LB-Agar die Biolumineszenz sofort nach Auftragen vollständig, nach 24 Stunden um 74-80% und nach 48 Stunden um 56-65% im Vergleich zur Kontrolle (Vorinkubation ohne Wachstumsüberstände) reduziert wurde. Der zunehmende Anstieg der Biolumineszenz nach Auftrag auf LB-Agar ist darauf zurückzuführen, dass es bedingt durch die Vorinkubation zwar zu einer deutlichen Inhibierung, aber keiner vollständigen Inaktivierung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE gekommen ist. Überlebende Zellen wuchsen daher nach Auftrag auf LB-Agar an und zeigten eine messbare Biolumineszenz. Dennoch waren während der gesamten Versuchsdauer deutliche Unterschiede zur Kontrolle messbar.

Die direkte Applikation der Wachstumsüberstände auf Minimalmedium, auf das zuvor *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert worden ist, führte zu einer deutlichen Unterdrückung der Biolumineszenz des Feuerbranderregers und einer ausgeprägten Ausbildung einer lytischen Zone, wo kein Wachstum des biolumineszenten Feuerbranderregers mehr zu beobachten war. Eine Re-Isolierung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE war nicht möglich, was aufzeigt, dass der Feuerbranderreger im Bereich der lytischen Zone vollständig inaktiviert worden ist.

Komponenten der hochmolekularen Fraktion zeigten eine Hitzeinstabilität sowie die beste Wirksamkeit bei pH 7,0. Die hochmolekularen Fraktionen von Wachstumsüberständen, bei denen die Zellen in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ angezogen worden waren, führten bei Hemmhoftests genauso zur Ausbildung einer lytischen Zone, wie Wachstumsüberstände von Zellen, die ohne 0,2 mM FeCl₃ angezogen worden waren, auch wenn diese etwas kleiner ausfiel.

Eine Analyse der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände (Bakterien angezogen in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose) mit 1D- und 2D-Gelelektrophorese zeigte zahlreiche Proteine in den Wachstumsüberständen, wobei sich Konzentration und Zusammensetzung derselben bei *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 voneinander unterschieden.

In Gegenwart von 0,5 mM CaCl_2 wurde von den *Pseudomonas*-Stämmen eine deutlich höhere Proteinkonzentration sekretiert als ohne Zugabe von CaCl_2 . Zusätzlich wurde in Gegenwart von CaCl_2 ein Protein mit einer geschätzten Größe von ca. 50 kDa stärker exprimiert. Hierbei handelt es sich um eine Metalloprotease mit großer Homologie zu AprA von *P. fluorescens* CHA0 (Siddiqui et al., 2005; keine Ergebnisse hierzu in dieser Arbeit gezeigt).

Die Produktion von extrazellulären Metalloproteasen durch Pseudomonaden in Gegenwart von 0,2-0,5 mM CaCl_2 mit Ähnlichkeit zur AprA von *P. fluorescens* CHA0 wurde bereits von Anderson et al. (2004), Liao und McCallus (1998) sowie Nicodème et al. (2005) beschrieben. Für die extrazelluläre Metalloprotease von *P. fluorescens* Bk3 konnte gezeigt werden, dass sie als Inhibitor der Konidienkeimung des pilzlichen Pathogens *V. inaequalis* fungiert (Hossain et al., 2009). Versuche mit einer Mutante von *P. fluorescens* A506, die die extrazelluläre Metalloprotease nicht mehr produziert (Anderson et al., 2004), zeigten aber im Vergleich zum Wildtyp keine verminderte antagonistische Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (keine Ergebnisse gezeigt). Wachstumsüberstände wurden dennoch bevorzugt durch Anzucht der Bakterien in Gegenwart von 0,5 mM CaCl_2 gewonnen, da der höhere Proteingehalt zu einer besseren Handhabung der Proben sowie einer besseren Darstellbarkeit der Proteine in der Gelelektrophorese führte.

Die Versuchsergebnisse der Vorinkubationsversuche und Hemmhoftests zeigen klar auf, dass die hochmolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 Komponenten enthalten, die den Feuerbranderreger unter *in vitro* Bedingungen sowohl nach Vorinkubation auf einem Voll- als auch bei direktem Auftrag auf einem Minimalmedium hemmen können. Auch wenn kein Bezug zur extrazellulären Protease hergestellt werden konnte, so spricht die Empfindlichkeit dieser Komponenten gegenüber Hitze und eine gewisse pH-Abhängigkeit (höchste Wirksamkeit bei pH 7,0) in Bezug auf ihre Wirksamkeit dafür, dass es sich um Proteine handelt.

Die Involvierung von Proteinen in die Hemmung von Pathogenen durch Antagonisten ist möglich und wurde bereits in der Literatur diskutiert.

Beispielsweise konnte für *B. cereus* 8A gezeigt werden, dass dieser Stamm ein Cerein produziert, das als Peptid-Antibiotikum bakterizid auf *Listeria monocytogenes*, ein gram-positives, Lebensmittel-verderbendes Bakterium wirkt, indem es Zellmembran- und Zellwandwandfunktionen stört (Bizani et al. 2005). Für einen anderen *Bacillus* Stamm (*myloliuefaciens*) konnte ein Bakteriozin nachgewiesen werden, dass in Agar-Diffusionsversuchen antimikrobiell gegenüber pathogenen oder Lebensmittel-verunreinigenden Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *Serratia marcescens* and *Pasteurella haemolytica* wirkt (Lisboa et al., 2006).

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 produzierten auf Minimalmedium Hemmhöfe, in denen zunächst ein schwaches Wachstum der Bakterien beobachtet werden, von denen der

Feuerbranderreger aber nach 48 Stunden nicht mehr reisoliert werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen für eine Lyse von *E. amylovora* 222 im Bereich der Hemmhöfe.

Die Freisetzung lytischer Enzyme durch antagonistisch wirksame Bakterien konnte zum Beispiel bereits für *P. fluorescens* PfMDU2 gezeigt werden, wo ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Produktion von β -1,3-Glukanase und der Hemmung des Pilzes *Rhizoctonia solani*, dem Erreger des Reis-Blattscheidenbrand, besteht (Nagarajkumar et al., 2004). Helistö et al. (2001) beschreiben sogar einen Komplex von Enzymen von *Bacillus* sp. X-b, der sich lytisch auf Zellwände der Holz-zerstörenden Basidiomyceten *Macrolepiota procera* und *Polyporus squamosus* auswirkt. Bei diesen Beispielen muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich um Antagonisten pilzlicher Pflanzenpathogene handelt und die hier beschriebenen inhibitorischen Wirkungen auf Grund struktureller Unterschiede wie bspw. dem Aufbau der Zellwand nicht direkt auf Bakterien übertragen werden können.

Der genaue Charakter der Proteine von *P. fluorescens* A506 und Bk3, die in die Hemmung oder sogar Lyse von *E. amylovora* 222 involviert sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Möglicherweise wird die Lyse von *E. amylovora* 222 aber nicht durch hydrolytische Enzyme von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 verursacht, sondern durch eine Inhibierung der Zellwandsynthese des Feuerbranderregers. Denkbar wäre auch eine inhibitorische Wirkung bedingt durch Ionophore. Hierbei handelt es sich um Moleküle, die selektiv Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oder Mg^{2+} binden und über Membranen transportieren können. Ionophore von Mikroorganismen können eine antibiotische Wirkung haben, wenn sie in die Zellmembran anderer Zellen integriert werden und dort zu einer Störung des Ionenhaushaltes/Ionenkonzentrationsgefälles führen (Pressman, 1976).

Eine genauere Untersuchung der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 und Bk3 ist auf Grund der verschiedenen möglichen inhibitorisch wirksamen Moleküle in Zukunft noch nötig.

Neben der extrazellulären Proteinfraction wurde auch das Periplasma der gewählten bakteriellen Antagonisten auf eine inhibitorische Wirkung gegenüber dem biolumineszenten Feuerbranderreger untersucht.

Periplasma wurde aus Kulturen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gewonnen, die in LB-Medium angezogen worden waren. Die Untersuchung auf eine inhibitorische Wirkung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE fand im Rahmen von Vorinkubationsversuchen statt, wobei diese Versuchsansätze nach Vorinkubation auf LB-Agar gespottet worden sind.

Bei diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die hochmolekulare Fraktion des Periplasmas ebenso wie die hochmolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände zu einer deutlichen Inhibierung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE führte. Bei Vorinkubation mit der niedermolekularen Fraktion wurde keine Hemmung des biolumineszenten Feuerbranderregers beobachtet.

Anhand dieser Versuchsergebnisse kann ausgesagt werden, dass die hochmolekulare Fraktion des Periplasmas von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 Komponenten enthält, die den Feuerbranderreger unter *in vitro* Bedingungen nach 24-stündiger Vorinkubation auf einem Vollmedium hemmen können. Die Hemmung fällt aber im Vergleich zu den Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 um bis zu 33% geringer aus; zudem wurde die dreifache Menge an Protein eingesetzt, um die beobachteten Effekte erzielen zu können.

Das Periplasma ist ein gelartiger Raum zwischen der Bakterienwand und -membran gramnegativer Bakterien und enthält eine hohe Konzentration an Proteinen, die in verschiedene biochemische Prozesse eingebunden sind (Ehrmann, 2007). Beschrieben wurden beispielsweise Bindeproteine, hydrolytische Enzyme oder Transportproteine (Ames, 1986; Cook, 1988; Danese und Silhavy, 1998; Dwyer und Hellings, 2004; Martinez et al., 1999).

Somit kommen verschiedenste Proteine in Frage, die sich inhibitorisch auf den Feuerbranderreger auswirken könnten, indem sie zum Beispiel essentielle Nährstoffe rekrutieren, sich lytisch auf Zellwand oder Membranen des Pathogens auswirken oder in anderer Weise den Stoffwechsel beeinflussen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Periplasma und Antagonismus ist bislang aber nicht in der Literatur beschrieben worden.

Eine nähere Charakterisierung der Proteine des Periplasmas in Bezug auf inhibitorische Proteine hat im Rahmen dieser Arbeit nicht stattgefunden. Der Fokus der Untersuchungen wurde vielmehr auf Komponenten der hoch- und niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände gelegt.

4.7 Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion (<5 kDa) der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3

Die Charakterisierung der niedermolekularen Fraktionen (<5 kDa) der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 erfolgte durch Beurteilung ihrer inhibitorischen Wirksamkeit gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch Vorinkubationsversuche (mit Auftrag von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf LB-Agar) und Hemmhoftests (auf Minimalmedium). Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Fraktionen mit Gelfiltration, Dünnschichtchromatographie sowie Massenspektrometrie. Die Kontrollkapazität der niedermolekularen Fraktionen gegenüber dem biolumineszenten Feuerbranderreger wurde zusätzlich mit Blütenversuchen überprüft.

Bei einer Vorinkubation des biolumineszenten Feuerbranderregers mit den niedermolekularen Fraktionen und einem Aufspotten auf LB-Agar nach 24 Stunden konnte keine Inhibierung des Pathogens beobachtet werden. Wurden allerdings 15 µl der niedermolekularen Fraktionen auf Minimalagar gespottet, auf den zuvor *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert worden

war, so konnte sowohl eine Unterdrückung der Biolumineszenz des Feuerbranderregers als auch die Ausbildung einer ausgeprägten lytischen Zone beobachtet werden.

Ähnlich wie bei der hochmolekularen Fraktion führte eine Erhitzung der niedermolekularen Fraktion zu einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Wirkung.

Die Ergebnisse zeigen an, dass *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 neben hochmolekularen Substanzen mit inhibitorischer Wirkung auf den Feuerbranderreger auch niedermolekulare, hitzeinstabile Komponenten mit hemmender Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE sekretieren. Die inhibitorische Wirkung war aber nur auf Minimalmedium zu beobachten.

Wie bereits im Vorfeld genannt, wurde Ähnliches schon von Vanneste et al. (1992) und Wodzinski et al. (1987) beschrieben; auch hier konnte eine Überwindung der inhibitorischen Effekte des Feuerbrand-Antagonisten *E. herbicola* Eh2 durch *E. amylovora* bei Dual Culture Tests auf einem voll supplementierenden Medium beobachtet werden.

Die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte mittels Gelfiltration in zwei Peaks mit Retentionszeiten von jeweils ca. 40 und 60 Minuten unterteilt werden. Demnach besteht die niedermolekulare Fraktion mindestens aus zwei Substanzen bzw. zwei Substanzgemischen.

Beide Fraktionen führten bei Applikation auf Minimalagar, auf den zuvor *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert worden war, zu einer Hemmhofbildung. *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sekretieren demnach mindestens zwei verschiedene Komponenten mit unterschiedlichen apparenten molaren Massen, die in die Hemmung des Feuerbranderregers involviert sind und die sich mittels der hier verwendeten Gelfiltration voneinander trennen lassen.

Der Einsatz der Gelfiltration bei der Aufreinigung inhibitorisch wirksamer Substanzen, beispielsweise von Siderophoren oder antibiotischen Verbindungen, die durch *P. fluorescens*-Stämmen sekretiert worden sind, wurde bereits in der Literatur beschrieben. So konnte bspw. ein Thiazolin aus Kulturüberständen von *P. fluorescens* MM-B16 mit dieser Methode aufgereinigt werden, das sich inhibitorisch auf die pilzlichen Pathogene *Colletotrichum orbiculare* und *Phytophthora capsici* auswirkt. Mittels Gelfiltration konnten auch drei Pyoverdine von *P. fluorescens* 2-79 aufgereinigt werden, die Eisenionen binden und diese damit Phytopathogenen entziehen können (Lee et al. 2003; Xiao und Kisaalita, 1995).

Zudem ist die gleichzeitige Produktion mehrerer inhibitorisch wirksamer Moleküle für Pseudomonaden nicht ungewöhnlich. Für den *P. fluorescens* Stamm 220 konnten beispielsweise zwei Komponenten identifiziert werden, die das Getreide-befallende Bakterium *Pseudocercospora herpotrichoides* inhibieren (Clarkson und Lucas, 1997). Duffy und Défago (1999) untersuchten, welche Umweltfaktoren sich auf die Produktion der Antibiotika DAPG und PLT bzw. auf das Siderophor Pyochelin und Salizylsäure durch den Stamm *P. fluorescens* CHA0 auswirken, der beispielsweise ein natürlicher Antagonist des Tabakpathogens *Chalara elegans* ist. Die Charakterisierung des Stammes *P. fluorescens* Psd

identifizierte zwei Antibiotika (Pyrrolnitrin und Phenazin), die einen inhibitorischen Effekt auf die pilzlichen Pathogene *F. oxysporum* und *Verticillium dahliae* haben (Upadhyay und Srivastava, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch eine Auftrennung der niedermolekularen Fraktionen von Wachstumsüberständen mittels Gelfiltration durchgeführt, für deren Gewinnung *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ angezogen worden waren. Hier fehlte in den niedermolekularen Fraktionen Peak 1, und nur Peak 2 war nach etwa 60 Minuten noch detektierbar. Gleichzeitig verloren die niedermolekularen Fraktionen ihre inhibitorische Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE.

Mittels Dünnschichtchromatographie konnte gezeigt werden, dass Peak 1 aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 jeweils drei Komponenten enthält, wovon zwei unter UV-Licht eine blau-grüne Fluoreszenz aufweisen. Alle Komponenten ließen sich mit Ninhydrin färben, woraus zu schließen ist, dass es sich um Verbindungen mit primären und sekundären Aminen handelt. Die Komposition der Spots in der niedermolekularen Fraktion von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 schien dabei recht ähnlich zu sein, was auch durch Massenspektrometrie bestätigt werden konnte. Die hier detektierten Massenpeaks waren für *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 nahezu identisch (259, 497 und 735 m/z bei *P. fluorescens* A506, bei Bk3 jeweils +1 m/z, was auf eine zusätzliche Protonierung der Komponenten in der Probe zurückzuführen sein könnte).

In Peak 2 konnte für *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 unter anderem ein Spot mit violetter Fluoreszenz unter UV-Licht gezeigt werden. Auch dieser war neben Peak 1 nach Anzucht der Bakterien in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ nicht mehr nachweisbar.

Eine der wesentlichen Charakteristika von *P. fluorescens* Stämmen ist die Produktion von Pyoverdinen (Varma und Chincholkar, 2007). Pyoverdine gehören zu den Siderophoren, hierbei handelt es sich um Verbindungen mit einem niedrigen Molekulargewicht und einem Liganden, der eine hohe Spezifität für Eisenionen aufweist, aber auch andere Ionen wie Ag⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ oder Ni²⁺ mit geringerer Effizienz binden kann. Unter UV-Licht (312 nm) zeigen sie eine grün-blaue Fluoreszenz; damit können sie zuverlässig auf Kings' B Medium (einem Minimal- und Eisenmangelmedium) detektiert werden (Braud et al., 2009; Höfte et al., 1992; King et al., 1954; Varma und Chincholkar, 2007).

Pyoverdine bestehen aus einem Dihydroxychinolin-Chromatophor, das mit einer Peptidkette, bestehend aus sechs bis zwölf Aminosäuren, sowie einer Carbonsäure verbunden ist (Fernández et al., 2001).

Da die Konzentration an Eisen-Ionen in der Umwelt in den meisten Fällen limitiert ist, wird die Produktion von Pyoverdinen durch die gegebene Eisen-Konzentration reguliert. Sofern Eisen-supplementierende Bedingungen vorliegen, wird die Bildung von Pyoverdinen unterdrückt (Joyner und Lindow, 2000; Meyer und Stinzi, 1998; Rachid und Ahmed, 2005).

Auf Grund ihrer Fluoreszenz-Farbe unter UV-Licht, dem positiven Ninhydrin-Farbstest, der auf das Vorliegen von primären und sekundären Aminen hinweist, sowie die Unterdrückung der blau-grünen Spots in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ im Kulturmedium ist es sehr wahrscheinlich, dass Peak 1 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 Pyoverdine beinhaltet, sowie Peak 2 zusätzlich eine Eisen-regulierte Komponente.

Gelfiltrationsfraktionen aus Peak 1 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zeigten eine ausgeprägte inhibitorische Wirkung auf *E. amylovora* 222 unter *in vitro*-Bedingungen auf Minimalagar; bei Anzucht der Bakterien in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ konnte aber weder Peak 1 noch eine Hemmung des Feuerbrandreggers durch die niedermolekulare Fraktion gezeigt werden. Die Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass Pyoverdine von *P. fluorescens* A506 und Bk3 in die Inhibierung von *E. amylovora* 222 involviert sind.

Dieser Wirkmechanismus wäre insofern nicht unwahrscheinlich, da Eisen – welches durch Siderophore der Zelle bereitgestellt wird – für zahlreiche Signal- und Stoffwechselprozesse benötigt wird. Eine Eisenlimitierung wirkt sich allgemein (und in diesem Fall für *E. amylovora* 222) wachstumshemmend aus (Expert, 1999).

Ein Zusammenhang zwischen der Produktion von Siderophoren durch Pseudomonaden und dem Antagonismus gegenüber Pflanzenpathogenen konnte bereits dargestellt werden. *P. fluorescens* PFS6 produziert beispielsweise zwei verschiedene Siderophore, die sich inhibitorisch auf *E. carotovora* var. *carotovora*, dem Verursacher der Knollenfäule bei Kartoffeln, auswirken (Helmy et al., 2008). Henry et al. (1991) zeigten, dass die Supplementierung des Kulturmediums mit FeCl₃ zu einem Verlust der antagonistischen Wirkung verschiedener *Pseudomonas* Stämme auf *P. tolaasii*, dem Verursacher von „bacterial blotch“, einer bakteriell bedingter Fleckenkrankheit bei Kulturpilzen, führt.

Eine Arbeit von Hamdan et al. (1991) zeigte hingegen keinen Verlust der antagonistischen Wirkung von Pyoverdin-defizienten *P. fluorescens* 2-79 auf den Pilz *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; hier muss allerdings berücksichtigt werden, dass dieser Stamm neben der Produktion von Pyoverdinen auch noch PCA sekretiert, wobei es sich um ein Antibiotikum mit hoher inhibitorischer Wirkung auf das Pathogen handelt.

Neben PCA können auch Antibiotika wie DAPG und PLT von vielen verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen sekretiert werden (De Souza und Raaijmakers, 2003; Raaijmakers et al., 1997). Ein Zusammenhang zwischen der Produktion dieser Antibiotika und der Inhibierung vor allem pilzlicher Phytopathogene ist bereits häufig in der Literatur beschrieben worden (Velusamy und Gnanamanickam, 2003; Kavitha et al., 2005; Maurhofer et al., 1994). Für *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte allerdings keine Produktion von DAPG, PLT und PCA nachgewiesen werden. Diese Antibiotika können also nicht mit für die Hemmung des Feuerbrandreggers verantwortlich sein.

Neben den oben genannten Antibiotika produzieren viele Pseudomonaden zusätzlich HCN (Knowles, 1976; Leisinger und Margraff; 1979, Ramette et al., 2003). Ein Zusammenhang zwischen der Produktion von HCN und einer direkten Inhibierung von Pflanzenpathogenen konnte zusätzlich bereits hergestellt werden (Corbell und Loper, 1995; Haas und Défago, 2005; Laville et al., 1992; Paul und Sarma, 2006), allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass *P. fluorescens* A506 und Bk3 keine HCN-Produzenten sind.

Nach Ausschluss der Produktion für Pseudomonaden typischer Antibiotika oder HCN durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 kann daher vermutet werden, dass vor allem Pyoverdine und möglicherweise auch andere Siderophore in der niedermolekularen Fraktion für deren stark hemmende Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE verantwortlich sind. Die Involvierung von Pyoverdinen in die Suppression des Feuerbranderreger ist eine neue, in der Literatur bislang nicht beschriebene Erkenntnis.

Der zuvor beschriebene violett fluoreszierende Spot in Peak 2 der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, der bei Anzucht der Bakterien in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ nicht mehr nachweisbar gewesen ist, konnte durch vergleichende Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie mit einem Salizylsäure-Standard sowie durch Anfärben mit Eisen-Reagenz als Salizylsäure identifiziert werden.

Salizylsäure stellte sich in der Massenspektrometrie sowohl beim Standard als auch in den Proben von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in drei Hauptpeaks mit Größen von 325, 327 und 329 m/z dar.

Die Säure hat ein Molekulargewicht von 138,12 g/Mol. Untersuchungen haben gezeigt, dass Salizylsäure Fe³⁺ komplexieren kann, indem sich zwei bis drei Moleküle Salizylsäure an ein Fe³⁺-Ion lagern (Pathel und Singh, 2009; Luther et al., 1992). Die Komplexbildungskonstante von zwei Molekülen Salizylsäure mit einem Fe³⁺ Ion beträgt ca. 29 ([FeL₂]/logβ) und zeigt somit einen recht stabilen Komplex an (Šipoš et al., 2008).

Geht man in den hier gemessenen Proben von einem solchen Komplex aus, so errechnet sich ein Molekulargewicht von ca. 329 g/Mol. In der hier verwendeten MS wurden nach dieser Berechnung also Salizylsäuremoleküle gezeigt, die bereits Fe³⁺ Ionen komplexiert hatten.

Die anderen Massen sind möglicherweise auf deprotonierte Formen des Salizylsäure-Eisen-Komplexes zurückzuführen.

Eigentlich ist Salizylsäure ein Nebenprodukt bei der Synthese von Pyochelin, einem Siderophor, das auch von verschiedenen *P. fluorescens*-Stämmen gebildet werden kann (Crosa und Walsh 2002, Visca et al. 1993). Es kann ebenfalls Eisen komplexieren und hat damit Siderophor-ähnliche Eigenschaften. Die Produktion von Salizylsäure wird vergleichbar wie die Pyoverdinsynthese durch Eisen reguliert, wobei eine Supplementierung des Kulturmediums ab 0,1 mM FeCl₃ zu einer Herunterregulation führt (Visca et al., 1993).

Die Produktion von Pyochelin durch *P. fluorescens* A506 und Bk3 ist unklar. Ein Pyochelin-Nachweis wurde mit Ammonium-Silbernitrat-Reagenz durchgeführt (Ankenbauer und Cox, 1988), aber das Sprühreagenz führte zu einer starken Hintergrundfärbung und hat keine Beurteilung auf ein Vorliegen von Pyochelin zugelassen (keine Ergebnisse in dieser Arbeit gezeigt).

Salizylsäure war bei einer Konzentration von 145 μM in Minimalagar stark inhibitorisch auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Eine gleichzeitige Supplementierung des Kulturmediums mit Salizylsäure sowie äquimolaren, geringeren oder höheren Mengen an FeCl_3 zeigte, dass eine Zugabe von Eisen nur in einem geringen Ausmaße die durch Salizylsäure bedingte inhibitorische Wirkung auf den biolumineszenten Feuerbranderreger aufheben konnte. Für alle Ansätze war nach wie vor eine deutliche Wachstumshemmung des Feuerbranderregers zu beobachten.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die durch *P. fluorescens* A506 und Bk3 sekretierte Salizylsäure in die Inhibierung von *E. amylovora* durch die Antagonisten involviert sein könnte. Da eine zusätzliche Supplementierung des Kulturmediums mit FeCl_3 nicht zu einer Aufhebung der hemmenden Wirkung führte, ist davon auszugehen, dass Salizylsäure nicht allein Eisen-komplexierend wirkt, sondern zusätzlich antimikrobielle Eigenschaften haben muss.

Im Zusammenhang mit der Bekämpfung von Pflanzenpathogenen wird Salizylsäure allerdings eher als Induktor der systemic acquired resistance (SAR), also der Pflanzen-eigenen Abwehr von Pathogenen, beschrieben. Die Behandlung beispielsweise von Tabakpflanzen mit *P. fluorescens* P3, einem Salizylsäure-produzierenden Stamm, induziert SAR genauso wie eine Behandlung von Kichererbsen-Pflanzen mit dem Stamm *P. fluorescens* Pf4–92, der ebenfalls ein Salizylsäure-Produzent ist (Maurhofer et al., 1998; Saikia et al., 2003). Eine mögliche Aktivierung der pflanzeigenen Pathogenabwehr bei verschiedenen *M. domestica*-Kultivaren mittels einer Leucin-rich repeat (LRR) Rezeptor-Protein-Kinase bei einer Infektion der Pflanze mit *V. inaequalis* oder durch Behandlung mit Salizylsäure ist ebenfalls bereits diskutiert worden (Komjanc et al., 1999).

Salizylsäure wird zusätzlich allgemein eine antimikrobielle Eigenschaft zugeschrieben. Anwendung findet sie beispielsweise bei der Behandlung von Hauterkrankungen (Hartmann, 1990) oder in der Geflügelindustrie (Hinton und Cason, 2007); auf Grund ihrer keratolytischen Eigenschaften (hornsichtlöstend) kann sie abgestorbene Hautschichten ablösen und damit die Befallsdichte durch Bakterien auf der Haut vermindern. Untersuchungen konnten außerdem zeigen, dass die Säure die Produktion extrazellulärer Biofilme durch das Pathogen *S. epidermidis* verhindern kann (Teichberg et al., 1993).

Eine direkte Inhibierung von Phytopathogenen durch Salizylsäure ist in der Literatur allerdings kaum beschrieben.

Die Inhibierung von *Aspergillus niger*, *Candida albicans* oder *P. aeruginosa* durch Pflanzenextrakte von *Filipendula ulmaria*, die Salizylsäure enthalten, wurde bspw. durch Rauha et al. (2000) gezeigt, die *in vitro* Inhibierung von *E. carotovora* durch Salizylsäure von Lyon und McGill (1988).

Eine direkte Hemmung von *E. amylovora* durch Salizylsäure unter *in vitro* Bedingungen ist allerdings im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben worden. Auf Grund der ausgeprägten direkten inhibitorischen Wirkung von Salizylsäure auf den Feuerbranderreger und dem indirekten Effekt durch die Induktion der SAR der Wirtspflanze könnte diese aber ein vielversprechender Ansatz in der Bekämpfung von Feuerbrand sein.

Die inhibitorische Wirkung der niedermolekularen, extrazellulären Fraktion auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE konnte nicht nur unter *in vitro* Bedingungen gezeigt werden, auch auf Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox konnte eine Kontrolle des biolumineszenten Feuerbranderregers beobachtet werden. Ausschließlich infizierte Blüten zeigten hier bereits nach 24 Stunden eine ausgeprägte Feuerbrandsymptomatik, während die meisten mit der niedermolekularen Fraktion vorbehandelten Blüten keine Symptome entwickelten. Mittels Biolumineszenzmessung war *E. amylovora* 222::TnluxCDABE allerdings während der gesamten Versuchsdauer sowohl auf vorbehandelten als auch auf unbehandelten Blüten nachweisbar.

Jahreszeitenbedingt stand nur eine sehr geringen Blütenanzahl (max. neun Blüten/Versuchsansatz) zur Verfügung, so dass dieser Ansatz als Vorversuch zu werten ist. Die Versuchsergebnisse deuten aber darauf hin, dass durch die Vorbehandlung mit der niedermolekularen Fraktion zumindest eine Symptomentwicklung verhindert werden konnte, auch wenn der biolumineszente Feuerbranderreger stoffwechselaktiv blieb.

Ein Pflanzenschutzmittel für Feuerbrand muss allerdings nicht zwingend eine bakteriozide Wirkung haben. Zwar bewirkt das populärste Mittel Streptomycin tatsächlich eine vollständige Inaktivierung von *E. amylovora*, Oxytetracyclin hat aber beispielsweise nur eine wachstumshemmende Wirkung (McManus et al., 2002). Auch kupferhaltige Pflanzenschutzmittel sind nicht immer bakterizid, sondern haben eher Stoffwechselhemmende Eigenschaften (Geider, 1999; Ordax et al., 2006).

Die hier verwendete Kontrolle des Stoffwechselstatus von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE über Messung der Biolumineszenz ist zudem eine sehr sensitive Methode; regulär werden nach Versuchsende Blüten oder andere Pflanzenteile abgewaschen, die Bakterien so reisoliert und anschließend auf Kulturmedien ausplattiert, um zu überprüfen, inwieweit der Feuerbranderreger auf den Pflanzen überlebt und sich vermehrt hat (z.B. Johnson et al., 2004; Lindow et al., 1996). Möglicherweise hätten solche Waschversuche auch hier durchgeführt werden müssen, um abschätzen zu können, ob auf den vorbehandelten Blüten weniger Bakterien überlebt haben als auf den unbehandelten.

Wird davon ausgegangen, dass tatsächlich ein Siderophor wie Pyoverdin oder Salizylsäure, produziert von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, in die Inhibierung des Feuerbranderregers auf Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox involviert ist, so müssen diese Ergebnisse noch einmal aus einer anderen Sichtweise diskutiert werden.

E. amylovora produziert wie *P. fluorescens*-Stämme Siderophore wie das Desferrioxamin. Mutageneseversuche konnten zeigen, dass eine Unterbrechung der Eisenaufnahme durch Siderophore oder deren Rezeptoren zu einer Herabsetzung der Pathogenizität des Feuerbranderregers führen (Dellagi et al., 1998; Eastgate, 2000; Oh und Beer, 2005). Eisen ist also ein limitierender Faktor für *E. amylovora* und wird für eine erfolgreiche Infektion benötigt; möglicherweise konnte hier bedingt durch einen Eisenentzug keine Ausbreitung der Bakterien in den Blüten erfolgen.

Eisen spielt allerdings gleichzeitig auch eine Rolle bei der Abwehr von Pathogenen durch die Wirtspflanze. Wird ein Pathogen durch die Pflanze erkannt, so kann die Pflanze in einem frühen Stadium der Infektion die sogenannte „hypersensitive response (HR)“ bewirken. Bei der HR kommt es zu einer Anhäufung reaktiver Oxygen-Spezies und im Rahmen der Fenton-Reaktion können aus Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Eisen Hydroxyl-Radikale gebildet werden. Diese wiederum bewirken den Zelltod der Pflanzenzelle und umliegender Gewebe und können damit pathogene Bakterien am Eindringen in die Pflanze hindern (Expert, 1999; Lamb und Dixon, 1997).

Bakterien sind wie die Wirtspflanze in der Lage, beispielsweise durch die Synthese von Superoxiddismutasen (SOD) diese Radikale wieder in Wasserstoffperoxid umzuwandeln und sich damit praktisch zu „entgiften“. Die Synthese von SOD wird wiederum bspw. bei *E. coli* ebenfalls positiv durch die Verfügbarkeit von Eisen reguliert (Dubrac und Touati, 2000).

Auch aus diesem Grund wären Eisen-komplexierende Moleküle ein interessanter Ansatz in der Bekämpfung des Feuerbranderregers: Wird *E. amylovora* Eisen entzogen, so könnte durch den Eisenentzug die Synthese von Radikal-entgiftenden Enzymen durch den Feuerbranderreger möglicherweise nicht mehr erfolgen.

Die ersten Vorversuche sind generell als vielversprechend zu werten, allerdings müssten weitere Versuche durchgeführt werden, bei denen nur 1×10^5 - 1×10^6 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zur Infektion eingesetzt werden. Diese Zellzahlen zeigten sich zur Infektion von Blüten mit dem Feuerbranderreger als ausreichend (Miller und Schroth, 1972). Zudem muss festgelegt werden, welches Volumen von der niedermolekularen Fraktion tatsächlich zur Vorbehandlung eingesetzt werden sollte. Möglicherweise ist die niedermolekulare Fraktion unter Durchführung der Versuchsansätze mit verbesserten Konditionen dann auch für eine komplette Inaktivierung des Feuerbranderregers auf Blüten geeignet.

4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse zur hoch- und niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 und Bk3

Für *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnten keine für Pseudomonaden typischen Phytopathogen-hemmenden Komponenten wie HCN, DAPG, PCA oder PLT nachgewiesen werden.

Dennoch wurde im Rahmen dieser Untersuchungen gezeigt, dass beiden Feuerbrand-Antagonisten sowohl hoch- als auch niedermolekulare Komponenten sekretieren, die auf Minimalagar – und teilweise nach Vorinkubation auch auf dem Vollmedium LB – zuverlässig zu einer starken Inhibierung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE führen.

Eine Identifizierung der hochmolekularen Komponenten mit inhibitorischer Wirkung ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich gewesen; da aber eine Hitzeempfindlichkeit sowie eine pH-Abhängigkeit ihrer Wirksamkeit beobachtet werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Komponenten um Proteine handelt.

Die Analyse der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände zeigte auf, dass diese zum einen sowohl bei *P. fluorescens* A506 als auch Bk3 Salizylsäure enthält, zum anderen mit hoher Wahrscheinlichkeit Siderophore wie Pyoverdin.

In Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ ist die Sekretion dieser Komponenten durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 unterdrückt worden, was typisch für die Produktion von Salizylsäure und Pyoverdin ist. Gleichzeitig ging dabei auch die inhibitorische Wirksamkeit der niedermolekularen Fraktion verloren. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass Salizylsäure, Pyoverdine und möglicherweise auch andere Siderophore wesentliche Komponenten sind, die für die Hemmung von *E. amylovora* durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 verantwortlich sind.

4.9 Zusammenfassung und Ausblick

Die Übertragung von Luziferasereportergenen auf das Pathogen *E. amylovora* 222 konnte erfolgreich durchgeführt werden und generierte autbiolumineszente Zellen, deren Biolumineszenz mit hoch-sensitiven CCD-Kameras gemessen werden konnte. Durch Messung der Biolumineszenz wiederum ist es möglich gewesen, inhibitorische Effekte auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE darzustellen.

Im Zentrum der Untersuchungen lag die Identifizierung der Wirkmechanismen der mikrobiellen Antagonisten *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 sowie *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3.

Für die Hefestämme *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 konnte nur eine inhibitorische Wirkung auf den biolumineszenten Feuerbranderreger bei Dual Culture Tests mit ganzen Zellen gezeigt werden, aber keine Hemmung durch sekretierte extrazelluläre Komponenten. Da die Hefen in der Lage sind, Kulturmedien anzusäuern, ist eine Verschiebung des pH-Wertes in einen Bereich, in dem der Feuerbranderreger nicht mehr wachsen kann, als Wirkmechanismus am wahrscheinlichsten.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 konnten *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Dual Culture Test auf LB-Medium komplett unterdrücken. Auf Minimalmedium wurde eine ausgeprägte Hemmhofbildung um die Kolonien von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gezeigt. Außerdem konnte durch isolierte extrazelluläre hoch- und niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zusätzlich mindestens auf Minimalmedium eine eindeutige Hemmung des biolumineszenten Feuerbranderregers gezeigt werden. Daraus folgt, dass *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 hoch- und niedermolekulare Substanzen mit inhibitorischem Effekt auf *E. amylovora* 222 in ihren Wachstumsüberstand sekretieren.

Eine weitere Charakterisierung der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände mittels Protein-Gelelektrophorese zeigte zahlreiche Proteine, die möglicherweise in die Hemmung des Feuerbranderregers involviert sein könnten. Auch konnte gezeigt werden, dass *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 ein verändertes Proteinmuster in Gegenwart von *E. amylovora* 222 sekretieren. *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 können demnach auf die Gegenwart von *E. amylovora* 222 reagieren. Ob diese verändert sekretierten Proteine direkt inhibitorisch auf den Feuerbranderreger wirken, ist aber ungeklärt.

Zur Ermittlung der funktionellen Wirkkomponenten in den Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 und Bk3 wurde eine Transposon-vermittelte Mutagenese mit beiden Stämmen durchgeführt. Diese generierte Mutanten, die nur noch eine eingeschränkte Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bewirkten. Die Detektion des Integrationsortes ergab allerdings, dass keine extrazellulären Komponenten direkt von der Mutagenese betroffen gewesen sind, sondern vielmehr allgemeine Stoffwechselprozesse. Einige der generierten Mutanten zeigten dadurch in Voll- oder Minimalmedien zwar ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, konnten aber in Hemmhoftests auf Minimalmedium trotzdem den biolumineszenten Feuerbranderreger vergleichbar zum Wildtyp hemmen.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist eine reine Wachstumskonkurrenz, die häufig in Bezug auf Antagonismus durch *P. fluorescens*-Stämme vermutet wird, auszuschließen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bereits nach wenigen Stunden und damit zu einem Zeitpunkt einsetzt, bei dem noch keine großen Unterschiede in der Zellzahl von Pathogen und Antagonist vorliegen.

Auf den Feuerbranderreger inhibitorisch wirksame Komponenten in der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnten hingegen charakterisiert und teilweise identifiziert werden. Eine Involvierung bekannter Antibiotika wie DAPG, PCA oder PLT sowie HCN konnte ausgeschlossen werden. Nach den Ergebnissen sind aber Pyoverdine und Salizylsäure an der Inhibierung des biolumineszenten Feuerbranderregers beteiligt; zudem konnte ein Salizylsäure-Standard unter *in vitro*-Bedingungen ebenfalls *E. amylovora* 222::TnluxCDABE stark hemmen.

Da sowohl Pyoverdine als auch Salizylsäure Eisen komplexieren können, ist eine Konkurrenz um Eisen möglicherweise ein wesentliches antagonistisches Wirkprinzip von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Salizylsäure zeigte allerdings zusätzlich auch bei ausreichender Eisen-Supplementierung eine bakterizide Wirkung auf den biolumineszenten Feuerbranderreger.

Um diese Theorie noch genauer zu belegen, wäre es sinnvoll, die Synthese von Pyoverdinen und Salizylsäure durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 durch gezielte Geninaktivierung zu unterbinden und anschließend ihre Kontrollkapazität gegenüber *E. amylovora* 222 zu überprüfen. Erwartungsgemäß sollten diese Mutanten dann den Feuerbranderreger nur noch eingeschränkt hemmen können.

Interessant wäre natürlich an dieser Stelle, ob die extrazellulären Komponenten von *P. fluorescens* bzw. Bk3 auch unter Freilandbedingungen und auf der Pflanze eine Infektion durch den Feuerbranderreger kontrollieren können. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der niedermolekularen Komponenten unter *in vivo* Bedingungen wurden Vorversuche mit Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox durchgeführt. Die Untersuchung zeigte, dass eine Vorbehandlung der Blüten mit der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zwar nicht zu einer Inaktivierung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE führte, aber auch keine Symptomentwicklung auf den Blüten zu beobachten gewesen ist.

Hier müssen weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden, um optimale Wirkungsbedingungen für die niedermolekulare Fraktion zu schaffen. Zudem sollte überprüft werden, ob aufgereinigte Wirkstoffe aus der niedermolekularen Fraktion immer noch *E. amylovora* 222 auf der Pflanze kontrollieren können. Auch muss untersucht werden, ob eine Kontrolle des Feuerbranderregers durch die hochmolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände auf Wirtspflanzen möglich ist.

Besonders vielversprechend zeigte sich zudem in dieser Arbeit die inhibitorische Wirkung von Salizylsäure auf den Feuerbranderreger; auch dieses sollte im Rahmen von Pflanzenversuchen überprüft werden.

Letztlich kann gesagt werden, dass bei der Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 synergistische Effekte eine Rolle spielen. Zum einen zeigen die Antagonisten ein deutlich schnelleres und effektiveres Wachstumsverhalten als der

Feuerbranderreger unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, zum anderen sekretieren sie mehrere verschiedene hoch- und niedermolekulare Komponenten, die den biolumineszenten Feuerbranderreger hemmen. Diese additiven Effekte führen zu einem sehr effektiven Antagonismus gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zumindest unter *in vitro*-Bedingungen.

Interessant wäre an dieser Stelle die Überprüfung, ob die Komponenten, die *E. amylovora* 222::TnluxCDABE hemmen, sich auch inhibitorisch auf andere Phytopathogene wie beispielsweise *V. inaequalis* auswirken. Möglicherweise wäre dann aus den von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sekretierten hoch- und niedermolekularen Komponenten die Generierung eines neuen Pflanzenschutzmittels möglich, das gegen verschiedene Phytopathogene von *Malus* und *Pyrus* wirksam ist.

5. Literaturverzeichnis

- Agrios, G. N. (2005) Plant Pathology, 5th Edition, Harcourt Academic Press
- Aldridge, P., Metzger, M. und Geider, K. (1997) Genetics of sorbitol metabolism in *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. *Molecular Genetics and Genomics* 256, 611-619
- Ames, G. F. L. (1986) Bacterial periplasmic transport systems: Structure, mechanism and evolution. *Annual Review of Biochemistry* 55, 397-425
- Anderson, L. M., Stockwell, V. O. und Loper, J. E. (2004) An extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* inactivates antibiotics of *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology* 94, 1228-1234
- Ankenbauer, R. G. und Cox, C. D. (1988). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants requiring salicylic acid for pyochelin biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 170, 5364-5367
- Azegami, K., Tsukamoto, T., Matsuura, T., Inoue, Y., Uematsu, H., Ohara, T., Mizuno, A., Yoshida, K., Bessho, H., Sato, S., Kimura, S. und Goto, M. (2006) *Erwinia amylovora* can pass through the abscission layer of fruit-bearing twigs and invade apple fruit during fruit maturation. *Journal of General Plant Pathology* 72, 43-45
- Bassler, B. L. (1999) How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* 2, 582-587
- Bencheqroun, S. K., Bajji, M., Massart, S., Labhilili, M., El Jaafari, S. und Jijakli, M. H. (2007) *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biology and Technology* 46, 128-135
- Bereswill, S. und Geider, K. (1997) Characterization of the *rcsB* gene from *Erwinia amylovora* and its influence on exopolysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. *Journal of Bacteriology* 179, 1354-1361
- Bericht über die Feuerbrandsituation (2003). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2003.html
- Bericht über die Feuerbrandsituation (2004). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2004.html
- Bericht über die Feuerbrandsituation (2005). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2005.html

- Bericht über die Feuerbrandsituation (2006). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2006.html
- Bericht über die Feuerbrandsituation (2007). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2007.html
- Bericht über die Feuerbrandsituation (2008). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Feuerbrandbericht2008.html
- Bericht über die Feuerbrandsituation (2009). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Feuerbrandbericht2009.html
- Bizani, D., Motta, A. S., Morrissy, J. A. C., Terra, R. M. S., Souto A. A. und Brandelli, A. (2005) Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. International Microbiology 8, 125-131
- Bogs, J., Bruchmüller I., Erbar, C. und Geider, K. (1998) Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*, marked with genes for bioluminescence and fluorescence. Phytopathology 88, 416-421
- Bogs, J., und Geider, K. (2000) Molecular analysis of sucrose metabolism of *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. Journal of Bacteriology 182, 5351-5358
- Boivin, R., Chalifour, F. P. und Dion, P. (1988) Construction of a Tn5 derivative encoding bioluminescence and its introduction in *Pseudomonas*, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. Molecular and General Genetics 213, 50-55
- Bonsall, R. F., Weller, D. M. und Thomashow, L. S. (1997) Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology 63, 951-955
- Boureau, T., ElMaarouf-Bouteau, H., Garnier, A., Brisset, M. N., Perino, C., Pucheu, I. und Barny, M. A. (2006) DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth in planta, induces cell death in host apple and nonhost tobacco plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 19, 16-24
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T. und Schalk, I. J. (2009) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. Environmental Microbiology 11, 1079-1091

- Broggini, G. A. L., Duffy, B., Hollinger, E., Schärer, H. J., Gessler, C. und Patocchi, A. (2005) Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) in a Swiss apple orchard. *European Journal of Plant Pathology* 111, 93-100
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (2002) *Biochemistry and molecular biology of plants*, 1st Edition, John Wiley and Sons
- Cabrefiga, J., Bonaterra, A. und Montesinos, E. (2007) Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *International Microbiology* 10, 123-132
- Chang, C. und Stewart, R. C. (1998) The two-component system. *Plant Physiology* 117, 723-731.
- Cheng, Y., McNally, D. J., Labbe, C. Voyer, N., Belzile, F. und Bélanger, R. R. (2002) Insertional mutagenesis of a fungal biocontrol agent led to discovery of a rare cellobiose lipid with antifungal activity. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2595-2602
- Cirvilleri, G. und Caldarera, G. (1998) Use of *lux*-marker genes to monitor survival of antagonistic *Pseudomonas fluorescens* on the phylloplane. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105, 441-451
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G. und Zhang, T. (2009) Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 793-804
- Clarkson, J. P. und Lucas, J. A. (1997) The role of antibiotic production by a strain of *Pseudomonas fluorescens* in the suppression of *Pseudocercospora herpotrichoides*, the causal agent of eyespot disease of cereals. *Journal of Applied Microbiology* 82, 499-506
- Cook, R. A. (1988) Periplasmic proteases of *Escherichia coli*. *Critical Reviews in Biotechnology* 8, 159-175
- Corbell, N. und Loper, J. E. (1995) A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology* 177, 6230-6236
- Crosa, J. H. und Walsh, C. T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 223-249
- Danese, P. N. und Silhavy, T. J. (1998) Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics* 32, 59-94
- Dellagi, A., Brisset, M. N., Paulin, J. P. und Expert, D. (1998) Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 734-742
- De Souza, J. T. und Raaijmakers, J. M. (2003) Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp.. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 21-34

- Dewdney, M. M., Biggs, A. R. und Turechek, W. W. (2007) A statistical comparison of the blossom blight forecasts of *MARYBLYT* and *COUGARBLIGHT* with receiver operating characteristic curve analysis. *Phytopatology* 9, 1164-1176
- Dubrac, S. und Touati, D. (2000) *Fur* positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: Functional analysis of the *sodB* promoter. *Journal of Bacteriology* 182, 3802-3808
- Duffy, B. K. und Défago, G. (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2429-2438
- Dwyer, M. A. und Hellinga, H. W. (2004) Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering. *Current Opinion in Structural Biology* 14, 495-504
- Eastgate, J. (2000) *Erwinia amylovora*: The molecular basis of fireblight disease. *Molecular Plant Pathology* 1, 325-329
- Ehrmann, M. (2007) *The Periplasm*. 1. Auflage, ASM Press, Washington DC
- Expert, D. (1999) Withholding and exchanging iron: Interactions between *Erwinia* ssp. and their host plants. *Annual Review of Phytopathology* 37, 307-334
- Fachtagung Bioobstbau (2009). Tagungsband Fachtagung Bioobstbau in Frick. Quelle: www.fibl.net/shop/pdf/tb-1489-obstbautagung.pdf
- Falkenstein, H., Zeller, W. und Geider, K. (1989) The 29 kb Plasmid, common in strains of *Erwinia mylonova*, modulates development of fireblight symptoms. *Journal of General Microbiology* 135, 2643-2650
- Fernández, D. U., Fuchs, R., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Munsch, P. und Meyer, J. M. (2001) The structure of a pyoverdine produced by a *Pseudomonas tolaasii*-like isolate. *Biometals* 14, 81-84
- Fernández-Pinas, F., Leganes, F. und Wolk, C. P. (2000) Bacterial *lux* genes as reporters in cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 305, 513-527
- Fernández-Pinas, F. und Wolk, C. P. (1994) Expression of *luxCDE* in *Anabaena* sp. can replace the use of exogenous aldehyde for *in vivo* localization of transcription by *luxAB*. *Gene* 150, 169-174
- Feuerbrand-Strategie-Papier des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (2008) Bekämpfung des Feuerbranderregers im Obstbau ohne Antibiotika. http://www.bmelv.de/cIn_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/Feuerbrand-Strategiepapier.html
- Ficke, W. und Mäurer, S. (1990) Methoden und Verfahren der Feuerbrandprognose (Übersichtsarbeit). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 1, 3-18
- Fiss, M. (2001) Evaluierung von epiphytischen Antagonisten zur biologischen Kontrolle des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis*. Dissertation, Universität Hannover

- Flachowsky, H., Szankowski, I., Fischer, T. C., Richter, K., Peil, A., Höfer, M., Dörschel, C., Schmooock, S., Gau, A. E., Halbwirth, H. und Hanke, M. V. (2010) Transgenic apple plants overexpressing the Lc gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight. *Planta* 231, 623-635
- Gau, A. E., Dietrich, C. und Kloppstech, K. (2002) Non-invasive determination of plant-associated bacteria in the phyllosphere of plants. *Environmental Microbiology* 4, 744-753
- Gau, A. E., Koutb, M., Piotrowski, M., Kloppstech, K. (2004) Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *European Journal of Plant Pathology* 110, 703-711
- Geider, K. (1999) Interference of copper sulphate in growth of *Erwinia amylovora*. *Journal of Phytopathology* 147, 521-526
- Goryshin, I. Y. und Reznikoff, W. S. (1998) Tn5 *in vitro* transposition. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 7367-7374
- Greer III, L. F. und Szalay, A. A. (2001) Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: A review. *Luminescence* 17, 43-74
- Haas, D. und Défago, G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 4, 307-319
- Haas, J. R., Morgan, N. und DiChristina, T. J. (2001) Effects of aqueous organic complexation on metabolic Fe(III) reduction by *Shewanella putrefaciens*. Eleventh Annual V. M. Goldschmidt Conference, May 20-24, Hot Springs, Virginia, Abstract Nr. 3757
- Hamdan, H., Weller, D. M. und Thomashow, L. S. (1991) Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3270-3277
- Handelsman, J. und Stab, E. V. (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8, 855-1869.
- Hartman, J. (2004) Using the MARYBLYT Computer Program to Aid in Apple and Pear Fire Blight Management. Plant Pathology Fact Sheet. http://www.ca.uky.edu/agcollege/plant_pathology/ext_files/ppfshtml/ppfs-fr-t-7.pdf
- Hartmann, H. H. (1990) The influence of various factors on the human resident skin flora. *Seminars in Dermatology* 9, 305-308
- Helistö, P., Aktuganov, G., Galimzianova, N., Melentjev, A. und Korpela, T. (2001) Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: Isolation and purification of components. *Journal of Chromatography B* 758, 197-205
- Helmy, M., Baddar, D. und El'Masry, M. H. (2008) Affinity purification of a siderophore that exhibits an antagonistic effect against soft rot bacterium. *Biochemistry Moscow* 7, 776-782

- Henry, M. B., Lynch, J. M. und Fermor, T. R. (1991) Role of siderophores in the biocontrol of *Pseudomonas tolaasii* by fluorescent pseudomonad antagonists. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 104-108
- Hinton, A. und Cason, J. A. (2007) Changes in the bacterial flora of skin of processed broiler chickens washed in solutions of salicylic acid. *International Journal of Poultry Science* 6, 960-966
- Höfte, M., Boelens, J. und Verstraete, W. (1992) Survival and root colonization of mutants of plant growth-promoting pseudomonads affected in siderophore biosynthesis or regulation of siderophore production. *Journal of Plant Nutrition* 15, 2253-2262
- Hossain, B. M., Lensing, J. und Gau, A. E. (2009) Inhibition of conidial growth of *Venturia inaequalis* by the extracellular protein fraction from the antagonistic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3. *Biological Control* 48, 133-139
- Ji, P. und Wilson, M. (2002) Assessment of the importance of similarity in carbon source utilization. Profiles between the biological control agent and the pathogen in biological control of bacterial speck of tomato. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4383-4389
- Johnson, K. B. und Stockwell, V. O. (1998) Management of fire blight: A case study in microbial ecology. *Annual Review of Phytopathology* 36, 227-248
- Johnson, K. B., Stockwell, V. O. und Sawyer, T. L. (2004) Adaptation of fire blight forecasting to optimize the use of biological controls. *Plant Disease* 88, 41-48
- Joyner, D. C. und Lindow, S. E. (2000) Heterogeneity of iron bioavailability on plants assessed with a whole-cell GFP-based bacterial biosensor. *Microbiology* 146, 2435-2445
- Kavitha, K., Mathiyazhagan, S., Sendhilvel, A., Nakkeeran, S., Chandrasekar, G. und Fernando, W. G. D. (2005) Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematode. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 38, 69-76
- Keane, P. J., Kerr, A. und New, P. B. (1970) Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Australian Journal of Biological Sciences* 23, 585-595
- Kellerhals, M., Patocchi, A., Duffy, B. und Frey, Jürg (2008) Modern approaches for breeding high quality apples with durable resistance to scab, powdery mildew and fire blight. *Organic Eprints, Ecofruit Conference*, 226-231
- King, E. O., Ward, M. K. und Raney, D. E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44, 301-307
- Kleerebezem, M., Quadri, L. E. N., Kuipers, O. P. und de Vos, W. M. (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 24, 895-904
- Knowles, C. J. (1976) Microorganisms and cyanide. *Bacteriological Reviews* 40, 652-680

- Komjanc, M., Festi, S., Rizzotti, L., Cattivelli, L., Cervone, F. und De Lorenzo, G. (1999) A leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (*LRPKm1*) gene is induced in *Malus domestica* by *Venturia inaequalis* infection and salicylic acid treatment. *Plant Molecular Biology* 40, 945-957
- Kürkcüoglu, S., Pietrowski, M., Klopstech, K., Gau, A. E. (2004) Up-regulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox after application of a non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the plant phyllosphere. *Zeitschrift für Naturforschung* 59c, 843-848
- Kürkcüoglu, S. (2006) Eine Strategie zur biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten durch den Einsatz natürlicher, nicht-pathogener mikrobieller Antagonisten am Modellsystem *Malus domestica* (Apfel)/*Venturia inaequalis* (Apfelschorferreger)/*Pseudomonas fluorescens* Bk3 (mikrobieller Antagonist). Dissertation, Institut für Botanik, Universität Hannover
- Kunz, S. (2004) Development of "Blossom-Protect" – a yeast preparation for the reduction of blossom infections by fire blight. 11th international conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing and viticulture, Weinsberg, Fördergemeinschaft ökologischer Obstbau e.V., 108-114
- Kunz, S. (2005) Fire blight control in organic fruit growing – systematic investigation of the mode of action of potential control agents. In W. Zeller, C. Ullrich (eds): Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases. Mitteilung der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 408, 249-253
- Kunz, S. und Haug, P. (2006) Development of a strategy for fire blight control in organic fruit growing. In: 12th International Conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruitgrowing and viticulture. (eds.) FÖKO, Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau e.V., Weinsberg, 145-150
- Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H. und Hiramatsu, K. (2003) Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 49, 807-821
- Lamb, C. und Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 251-275
- Larsen, R. A., Wilson, M. M., Guss, A. M. und Metcalf, W. W. (2002) Genetic analysis of pigment biosynthesis in *Xanthobacter autotrophicus* Py2 using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety of bacteria. *Archives of Microbiology* 178, 193-201
- Lauhon, C. T. und Kambampati, R. (2000) The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin and NAD. *The Journal of Biological Chemistry* 26, 20096-20103
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Défago, G. und Haas, D. (1992) Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 89, 1562-1566

- Lebert, I., Begot, C. und Lebert, A. (1998) Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25°C). *International Journal of Food Microbiology* 39, 53-60
- Lee, J. Y., Moon, S. S. und Hwang, B. K. (2003). Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugin produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2023-2031
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M. und Mendgen, K. (1997) Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *The American Phytopathological Society* 87, 1103-1110
- Leisinger, T. und Margraff, R. (1979) Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiological Reviews* 43, 422-442
- Liao, C. H. und McCallus, D. E. (1998) Biochemical and genetic characterization of an extracellular Protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 914-921
- Lin, Y. M., Chou, I. C., Wang, J. F., Ho, F. I., Chu, Y. J., Huang, P. C., Lu, D. K., Shen, H. L., Elbaz, M., Huang, S. M., und Cheng, C. P. (2008) Transposon mutagenesis reveals differential pathogenesis of *Ralstonia solanacearum* on tomato and *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 1261-1270
- Lindner, L (2008) Die Problematik der Fruchtberostung und des „Weißen Hauches“ 2008. *Obstbau*Weinbau* 12, 377-380
- Lindow, S. E., McGourty, G. und Elkins, R. (1996) Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear. *Phytopathology* 86, 841-848
- Lindow, S. E. und Suslow, T. V. (2003) Temporal dynamics of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in flowers in inoculated pear trees. *The American Phytopathological Society* 93, 727-737
- Lisboa, M. P., Bonatto, D., Bizani, D., Henrique, J. A. P. und Brandelli, A. (2006) Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus myloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International Microbiology* 9, 111-118
- Lorck, H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiologia Plantarum* 1, 142-146
- Luther III, G. W., Kostka, J. E., Church, T. M., Sulzberger, B. und Stumm, W. (1992) Seasonal iron cycling in the salt-marsh sedimentary environment: the importance of ligand complexes with Fe(II) and Fe(III) in the dissolution of Fe(III) minerals and pyrite, respectively. *Marine Chemistry* 40, 81-103
- Lyon, G. D. und McGill, F. M. (1988) Inhibition of growth of *Erwinia carotovora* *in vitro* by phenolics. *Potato Research* 31, 461-467

- Madigan, M. T. und Martinko, J. M. (2009) Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 11. aktualisierte Auflage
- Martinez, M. B., Flickinger, M. C. und Nelsestuen, G. L. (1999) Steady-state enzyme kinetics in the *Escherichia coli* periplasm: A model of a whole cell biocatalyst. *Journal of Biotechnology* 71, 59-66
- Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. und Défago, G. (1994) Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not of cucumber. *European Journal of Plant Pathology* 100, 221-232
- Maurhofer, M., Reimmann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D. und Défago, G. (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88, 678-684
- McCormack, P. J., Wildman, H. G. und Jeffries, P. (1994) Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 927-931
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W. und Jones, A. L. (2002) Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology* 40, 443-65
- Meighen, E. A. (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiological Reviews* 55, 123-142
- Meng, X., Kim, J. F., Bobasera, J. M., Nissinen, R. M., Borejsza-Wysocka, E., Malnoy, M. A., Aldwinckle, H. S. und Beer, S. V. (2006) Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 53-61
- Mengin-Lecreulx, D. und van Heijenoort, J. (1996) Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 32-39
- Meyer, T. S. und Lambert, B. L. (1965) Use of Coomassie Brilliant Blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochimica et Biophysica Acta* 107, 144-145
- Meyer, J. M. und Stintzi, A. (1998) Iron metabolism and siderophores in *Pseudomonas* and related species. In: Montie, T. C., *Pseudomonas*. *Biotechnology Handbooks*, 10, 209-239 (Plenum Press, New York)
- Miller, T. D. und Schroth, M. N. (1972) Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. *Phytopathology* 62, 1175-1182
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W. und O'Halloran, T. V. (2000) Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 182, 5864-5871

- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R. und Velazhahan, R. (2004) Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiological Research* 159, 73-81
- Nesternko, M. V., Tilley, M. und Upton, S. J. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 28, 239-242
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W (1998) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262
- Nicodéme, M., Grill, J. P., Humbert, G. und Gaillard, J. L. (2005) Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: Dependence of proteolytic activity on culture conditions. *Journal of Applied Microbiology* 99, 641-648
- Norelli, J. L., Jones, A. L. und Aldwinckle, H. S. (2003) Fire blight management in the twenty-first century. *Plant Disease* 87, 756-765
- Özaktan, H. und Borer, T. (2004) Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain EH24. *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 224-229
- Oh, C. S. und Beer, S. V. (2005) Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters* 253, 185-192
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M. und Biosca, E. G. (2006) Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: Induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3482-3488
- Pal, K. K. und Mc Spadden Gardener, B. (2006) Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02, APSnet
- Pathel, K. V. und Singh, A. (2009) Synthesis, characterization and chelating properties of benzimidazole-salicylic acid combined molecule. *E-Journal of Chemistry* 6, 281-288
- Paul, D. und Sarma, Y. R. (2006) Antagonistic effects of metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strains on the different growth phases of *Phytophthora capsici*, foot rot pathogen of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 39, 1-6
- Peil, A., Garcia-Libreros, T., Richter, K., Trognitz, F. C., Trognitz, B., Hanke, M. V. und Flachowsky, H. (2007) Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breeding* 126, 470-475
- Pflanzenschutzdienst (2006) Jahresbericht des Pflanzenschutzdienstes Baden-Württemberg. Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg (LTZ).
http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB//menu/1042836_11/index1215167085927.html

- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M. und Thomashow, L. S. (1997) Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 881-887
- Rachid, A. und Ahmed, B. (2005) Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology* 4, 697-702
- Rajendran, N., Rompf, A., Marahiel, M. A., und Jahn, D. (1998) Isolation and characterization of a transposon mutant of *Pseudomonas fluorescens* AU63 deficient in antifungal activity against *Pythium ultimum*. *Letters in Applied Microbiology* 27, 152-157
- Ramette, A., Frapolli, M., Défago, G. und Moënné-Loccoz, Y. (2003) Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 525-535
- Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. und Vuorela, P. (2000) Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* 56, 3-12
- Reddy, B. P., Reddy, K. R. N., Rao, M. S. und Rao, K. S. (2008) Efficacy of antimicrobial metabolites of *Pseudomonas fluorescens* against rice fungal pathogens. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 2, 178-182
- Saikia, R., Singh, T., Kumar, R., Srivastava, J., Srivastava, A. K., Singh, K. und Arora, D. K. (2003) Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbial Research* 158, 203-213
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379
- Schmoock, S. (2006) Infektion und Ausbreitung des Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* in An- und Abwesenheit des bakteriellen Antagonisten *Pseudomonas fluorescens* Bk3 auf verschiedenen Apfelnkultivaren. Diplomarbeit, Leibniz Universität Hannover
- Schroth, M. N., Thompson, S. V. und Hildebrand, D. C. (1974) Epidemiology and control of fire blight. *Annual Review of Phytopathology* 12, 389-412
- Seibold, A., Fried, A., Kunz, A., Moltmann, E., Lange, E. und Jelkmann, W. (2005) Yeasts as antagonists against fireblight. *EPPO Bulletin* 34, 389-390
- Siddiqui, I. A., Haas, D. und Heeb, S. (2005) Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5646-5649
- Singh, P., Piotrowski, M., Klopstsch, K. und Gau, A. E. (2004) Investigations on epiphytic living *Pseudomonas* species from *Malus domestica* with an antagonistic effect to *Venturia inaequalis* on isolated plant cuticle membranes. *Environmental Biology* 6, 1149-1156

- Šipoš, R., Šima, J., Tarapčik, P. und Gyurcsik, B. (2008) Solution properties of iron(III) complexes with 5-fluorosalicylic acid—spectra, speciation, and redox stability. *Chemical Papers* 62, 496-503
- Soncini, S. C. und Groisman, E. A. (1996) Two-component regulatory Systems can interact to process multiple environmental signals. *Journal of Bacteriology* 178, 6796-6801
- Taga, M. E. und Bassler, B. L. (2003) Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 100, 14549-14554
- Tang, J. L., Liu, Y. N., Barber, C. E., Dow, J. M., Wootton, J. C. und Daniels, M. J. (1991) Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Molecular and General Genetics* 226, 409-417
- Teichberg, S., Farber, B. F., Wolff, A. G. und Roberts, B. (1993) Salicylic acid decreases extracellular biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*: Electron microscopic analysis. *The Journal of Infectious Diseases* 167, 1501-1503
- Temple, T. N., Stockwell, V. O., Loper, J. E. und Johnson, K. B. (2004) Bioavailability of iron to *Pseudomonas fluorescens* strain A506 on flowers of pear and apple. *Phytopathology* 94, 1286-1294
- Thurn, K. K. und Chatterjee, A. K. (1985) Single-site chromosomal Tn5 insertions affect the export of pectolytic and cellulolytic enzymes in *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 894-898
- Unge, A., Tombolini, R., Mølbak, L. und Jansson, J. K. (1999) Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual *gfp-luxAB* marker system. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 813-821
- Upadhyay, A. und Srivastava S. (2008) Characterization of a new isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd as a potential biocontrol agent. *Letters in Applied Microbiology* 47, 98-105
- Vanneste, J. L., Yu, J. und Beer, S. V. (1992) Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology* 174, 2785-2796
- Varma, A. und Chincholkar, S. (2007) Microbial siderophores. Serie: Soil Biology, Vol. 12. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- Velusamy, P. und Gnanamanickam, S. S. (2003) Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol production by plant-associated bacteria and its role in suppression of rice bacterial blight in India. *Current Science* 85, 1270-1273
- Visca, P., Ciervo, A., Sanfilippo, V. und Orsi, N. (1993) Iron-regulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. *Journal of General Microbiology* 139, 1995-2001
- Wagner, C. Krönert, P. C. Lück, Jacobs, E. Cianciotto, N. P. und Helbig, J. H. (2007) Random mutagenesis of *Legionella pneumophila* reveals genes associated with

- lipopolysaccharide synthesis and recognition by typing monoclonal antibodies. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1975-1982
- Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S., und Regue, M. (1997) Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. *Journal of Bacteriology* 179, 7111-7117
- Whipps, J. M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52, 487-511
- Wijerathne, M. A. D. und De Costa, D. M. (2007) Use of Tn5 Transposon Mutagenesis to Screen *Burkholderia spinosa* Mutants Deficient in Antagonism against *Colletotrichum musae*. *Proceedings of the Peradeniya University Research Sessions* 12, 3-5
- Wilson, M. und Lindow, S. E. (1993) Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology* 83, 117-123
- Wodzinski, R. S., Sobiczewski, P. und Beer, S. V. (1987) Factors affecting production of herbicolacin 112Y by *Erwinia herbicola* 112Y. In: Civerolo, E. L., Collmer, A., Davis, R. E. und Gillapsie, A. G.. *Plant pathogenic bacteria*, 551-555. *Proceedings of the sixth international conference on plant pathogenic bacteria*, Dordrecht, The Netherlands
- Wright, S. A. I., Zumoff, C. H., Schneider, L. und Beer, S. V. (2001) *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 284-292
- Xiao, R. und Kisaalita, W. S. (1995) Purification of pyoverdines of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 by copper-chelate chromatography. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3769-3774
- Zhou, R., Sicher, R. C. und Quebedeaux, B. (2002) Apple leaf sucrose-phosphate synthase is inhibited by sorbitol-6-phosphate. *Functional Plant Biology* 29, 569-574
- van der Zwet, T. (2002) Present worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae* 590, 33-34

6. Anhang

Durch SEQLAB Sequence Laboratories ermittelte Sequenzen für die in pBluescript SK klonierten Fragmente der *P. fluorescens* A506-Mutanten

Ermittelte Sequenz für das in pBluescript klonierte Fragment von Mutante *P. fluorescens* A506 #8-42

```
5'NNNNTGNTGNAAGAGTAGCTTCAAGAGTCTTGCCCCGATTGCGCTGC
TCAAAGGGTCTCCCCCTATGCACAACACCGGAATCAAGCCACAAGCCTGT
GCTGCGGCGAACTTGTGGTTGAGCGTCCCATCCCGCTCGCCCATCATCT
GGCGACGCTCGGAGTGCCCCGACAAGCACATAGGAACAACCCGCGATCAA
CCAGCTGACTCGGCGAAATCTCGCCGGTCAACGCACTTGCATCGGCTC
TACCGCAGAGTTCTGCGCGCCGACCTGAATCGACTTGCCCTTCAAGCCA
TCAACCACCTTGGTTGATATGCAAGCAAGGCGGGAACACCGCGACGTCA
ACACCGCTAGGCAAGGCCAAGTGACGAAGGCCGTTGATCAGCTCACGA
CACTGGCGCGGGTACCGTGCATCTTCCAGTTACCAGCTACCATAGTGCG
ACGCTATGCTGTACCCCGTCCGTCAAAAGTGGGCGCAGATGTTACCCAA
CACATCATCACTGGCAAGCCGAATTCAGGCGCAAACCTTCAGTTACCA
TTTTTGCCAGGTCTTTCGGCATGGCCGCGAACCTGTGTTTTCGTCCTCGCCT
TCGACCATCACACGCAACAGCGGCTCTGTGCCGGACTTGCGCGAGCAAC
ACACGCCCCGCGCCCCGCCATTGCGCTGGGTCAACGCGCTCGCAAGCCTCTT
TGACAGCAGGGGTGCTCGATGGGGTTTTTTCGCCACCGGCCAAAACGCA
TTGAGCAGCACTTGTGGGCACTTGTGCGCAGGGCTTGACGCGCCTGGGGC
AGGCTCTCTCTCGCGGCGACGCGAGGGCCAAACAGCACCTGTAGCGCGGCG
ATGATCTCGCTCACCCGTGGTGGTGTGCTGGAAGCAGACCACTGTCGCCG
GAGTTCTCGCCGCCGACCAACCAGTTACGCTCCAGCAGCTCGGCGATC
ACGTAGCGGTCAACCGACATTGGCGCGGAATAAAGGGAATCCCCAGTTCT
GCCAACGCCAATTCCAGCCCGAGATTACTCATCAGAGTGCCGACCACN
NCCACCTTGCAGCTTGGTANNCTTTCATGCAGGTCNACGGGGCAATGAT
GACCAACNGGTCATCACATTCCACNGATCGGTGCCAGTGNNGATCCAC
CATCNGCACNCGGTCGCCATCACCCATCAAAAGNGATGCCCAAGGTCCG
CANGCTNCAGCNNNNAGCNGCCTGGCAGTNGCNNCATGT-3'
```

Ermittelte Sequenz für das in pBluescript klonierte Fragment von Mutante *P. fluorescens* A506 #19-56

```
5'CNNCNNTTGTGTATAAGAGTCAGGCGCAAGGCATCGAGCCAATGCAG
GTTGGTGGTCCACCAGTACCAGGTGCCGAGTACCAGCCAGGTCAACCAG
CAACAGGCCGAGCAAGCCTTGCACCTTGCTGGTCTTGATCAGCGCCCCG
ACGGTTGCCGCGCAAGGTGGCCACGTACAGGGCGAAACGGCAAGCTGCC
AAGGATCATTACCACCAACCGCGACCCAGTGCAACCGCCGGTTGTTTCCA
ATGGGCCCAGGGACTCGTCCGAGGTGGAAAACCCACCCGTTGGAAATCGC
CGACATCGCATGGTTGATCGCATCGAACACGCCCATTCGGGCCACCA
GAAGGCCAGGCTGCCGAAGATGGTGATGCCACATACGCCGCCACGAT
CAAGCGCGCCACCATGTGTGAGCGAGGCATGACCTTTTCCGAGCGATC
CGAGGATTTCGGTCTGGAACAGGCGCATGCCACCAATGCGCAGCAGCGG
GAGGATCGCCACCGCCATGCCGATAAAGCCGATACCGCCAAGCCAGTG
CAGCAACGAACGCCACATCAAAATGCCCGGCGACATGCTGTCCAGGCC
GCTCAACACGGTGGAGCCGGTGGCGGTGATGCCGGAACATGCTTTCAA
GAACGAGTCGGTGTAGCTGATGTGCTGGGTCAGCAAAAAGGGCAGGGC
GGCGAAGATGCACACCACCAACCAACTGCTGACCGTCAAGCAGGTACAT
GTCCCTGGGGCGCAGGTGCACGTGCTCGGGGCGGCCAGGAATGACCAA
CGCCAACCCGGCGATAAAGGTGATCAGGCTGGGCCACAGGAACGAGGG
CAGGTGCGTGGTTCGAAGATCACAGGGTTCGCCATCGGGATTAC
CATGGCGACCGCAAGGGTGATCAGGAAGATGCCGATGATGAAACCGAT
GATGCGCAGGGTTCGGCAACGCCATGAAGTTTCGCTCGGGTGATTGGGCA
GAGGCGCCATTCTACCCGCGGTGCGAGGTCTTGTAAACCGAGGGCTGCG
GGTTGATGGAGAACCCTTGTGGGGAGCTGGGCCTGGCCAGCGGCGNTA
TNTCACCTGACGCCCCGCAATCATNGTGGGGNNNCCTNGCTT-3'
```

Ermittelte Sequenz für das in pBluescript klonierte Fragment von Mutante *P. fluorescens* A506 #29-60

5'NNNNNNTANAGTCAGGTTGAAGACCTTCTTCAACGGCTTCCGTCGCG
ACGCCACCCGATGGCCGTCATGTGCGGTGTAGTAGGCGCCCTGTGCG
CCTTCTATCACGACTCCCTGGACATCAATAACCCGCGAGCATCGCGAAAT
TTCCGCGATCCGCCTGGTTGCCAAGATGCCTACCCTGGCCGCAATGGTT
TACAAGTACTCCATGGGCCAACCCATGATGTACCCGCGCAACGACCTG
ACGTACGCGGAAAACTTCCTGACATGATGTTCAACACCCCGTGCAGAG
ATCAAACCGATCAGCCCGGTGCTCGCCAAAGGCCATGGACCGGATCTTC
ATCCTCCACGCCGACGACGAGACGAGAACGCTTCCACCTTACCGTGCGCC
TGCGGGCTCTTTCGGGTGCCAACCCGTTCCGCTGTATTGCGCCGCGTAT
CGCCGCACTGTGGGGCCCTGCCACGGCGGTGCGAACGAAGCCGTATT
GACCATGCTCGATGAAATCGGCGATGTGTCCAACATCGACACCTTCATC
GCCAAGGCCAAGGACAAGAACGATCCGTTCAAGTTGATGGGGCTTCGGT
CACC GGCTCTACAAGAACCGCAGCCGCGCTACTGTGCATGAAGCAG
ACCTGCGACGAANTGTTGAAGGAACCTGGGCATCAAGAACGATCCGCAA
CTCGAACTGGCCATGCGCCTGGAAGAGATCGCCCTGACCGACCCGTAC
TTCATCNAACGTTCTCTGTACCCGAACGTCGACTTCTACTCGGGGATCA
TCCTCAAGCGATCGGCATTCCAACAGCATGTTACCGTGATCTTCGC
CCTGGCGCGGACCGTGGGCTGGATCTCCCACTGGAAAGAAATGCTCTC
CAGCCCGTACAAGATTGNCCGNCNCGCNCC-3'

Ermittelte Sequenz für das in pBluescript klonierte Fragment von Mutante *P. fluorescens* A506 #37-54

5'CCNNTNNTNNAAGAGTCAGGATCAGGCTCATGCGCCGCGAGGATCAGA
AACACTCCTAGCGGCGCGGTGCTGCAAGCCAGTACCAAACCGCCGAGG
AGTGCGCGGCGCATAAAGACGAACCTCATGAAACGGGCATCCATAAGTGG
GCAGTGAAAGTGCAATTCAGGCCACCTGCATCTGCGGTTGCGGGCGGATC
AGCTCTTTGCTGGGGCCGAATAACGCAGCCGGTGTTTTTGATCTGCAGTA
CGTGCTGGGTGTGGTGACGCACGGAGGCCAGGTCATGGCAGACGATCA
CCAGGGTGCGGCCTTCGTTGTGCCAAGCGTGATGTGTTTCCAGCACAG
CGCCTGACCGTCTTCATCGAGGGCTGCGTGAGGTTCTGTCGAGCAGCAG
CAGCGGTGCGTCCGCGCAGGCTCATGCGTGCCAGCAGGCGCGCTGCAA
TTCGCCTCCGGACAATGCCATCAACGGTCGGTGTTCCAAGCCAGTCAG
GCACCAGTCTTCGAGTACCGCTTGACAGGCGTTGGCTGCGTTGTTGCGGG
GTGTGTTGGATGCCCCAGAAACCGGCAGCGACCAGCTCTTGCAAGGCTG
ATGGGGAACCTGGCGGTCCAAGTGTGCTGCTGGGGCAAGAAGGCCAGG
CCGCCACGGCGTGGAACATCCACAATGACCTTTCCCGCAGCGGTTTTT
GCAGGCCGGCAATAACCTTGAGCAGGCTGCTTTTGCCTGTGCCATTGGC
GCCGATGATGCCGGTGAGGCTGCCTTTTTCCAGGGTCAAATCCAGTGCC
GGGGTGAGCGGTTGCCCGGGGGCACCCAGCGCAAAGAGTTACAGGTG
ATCATGCAAAGTCTCTCGTCCAGCGGCTTTCAGCCACGGCATCGTGCGC
GTGCAGGCTTTTCGGCGTGATCACTTGGAGGTGGAAGGCTTTGATGGC
ATCCGAGCGTTCAAGGCGAGGTTCAAGGCGGCGAGCGGCGTCTTCGNAG
ACATCAGGTTCTGCCCGTGGCCAGGCGAAAGGCTTGTCTNTCTGCGCGGT
CACC GCGATTGTACGGCGGTGGCCGAGGCGCGGCTCGNNGCGTTGAT
CAAGCGAACTATCGCAGTCAGTACTGCAACTGACGTGCAACTGCTNCT
NCTGCTTGCNNTGGNNNGACN-3'

Ermittelte Sequenz für das in pBluescript klonierte Fragment von Mutante *P. fluorescens* A506 #96-6-175

5'CGGACCNNGAACGACCTCGAATTNTGCANTACTTCGGGCCNGATNTG
GATCAAGACACACAGTGTGTGATTAAACATTGCACCGTNTCCTCTNGAT
TATCCANNCNTGGGCGCTACAGTNCCTNGTNATGGCAGCACCTATNNG
AACACCGTTGAGTGCTNNGTGCAGATGCAAACCTGNGTGTGANGGAC
CAGNNNAATNATCTNNGNGCTGGTNATNATTTTGNCGNCCNTNNGN
CATGNCTTTTCAACAANGAGAANTAANNNNTGGTNAGGNNGANNCTGCA
NNGGNNAATGATAACAGATCCGGGCACANGCGGGTCCATGTTCCNTGNA
CGANACGNCNCAATACTTCCCGGCTGTNNCAATGTNNATGNTGCTGA
CTGATCANGNNNCACAATTTCCAGCGGTGACNATCGGGAATCCGAAC
NNCTANAACAGCGTAATTGNTGAANCTCATGTNCANGCCCTTGANCTT
NCTNNTCACCCANTTANAGNCNCGTGGAAAATCATNANNTATNTNAAT
TGGGTGACACAGCTACTTCTTACAGTATTTGCAATGCNTCCTTGTGAT
GCAGGNTGACCTACAGAAANANTGNTNNTNNTGNTGNTNNTNNTGACN
GGNNGNANNANNNGACATTGTTNANNNGCCTACNTGACCACCNAGCTAA
TTNCGTTNNGCTNNNNNTNNTNNTNNTGNTNNTTCTNCTNNTNNTT
NANTGACAAACGAATACCTGATGNCCGGTTNANCTCTTTAATTNAGGTG
AGAGAAAGAAAGNCCATNNCCATANNNTNACCNATTCTNTAGTTNNGNNA

NNNCTTAACNCNAAANNNNGCTTGANNNTGCAACNGCGACTNTACGGTNA
 TNTGTGNCCGACTGAANAAAAAGGNNNCAAAAACTGTCTGTTAANATTC
 GATGNCTTGCCNAAGGAACTGCACAAANGCCTTNAAANATCANNNNTGN
 TCAAGGTGCAATATTTNCAATGGTAGTNTAAAAAACTCCNCCTTANAA
 ANANAAGGTGAGGGCTNANAATACAAATTTTGAANANTTGAANTTTT
 TGAANCGAATTTACTTCAAACATGNNNNNTTNTGGGAGGGGAGNTNAGC
 CACCCCGAATGGCCTTTTTCNTCATNANCAGNAANTTTNCTTGGGGNTTG
 AANTCCAACGNNTTGAAGGAATTGTTNGCCTTGATTNACGAAAA-3'

Durch SEQLAB Sequence Laboratories ermittelte Sequenzen für die in pBluescript SK klonierten Fragmente der *P. fluorescens* Bk3-Mutanten

Ermittelte Sequenz von Mutante *P. fluorescens* Bk3 #1-15, Primer tpnRL17

5'ACCTAGAGCCTCTCAAAGCAATTTTGAGTGACACAGGAACACTTAAAC
 GGCTGACATGGGGGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATGGTTGAG
 ATGTGTATAAGAGACAGGCGTAGACTTCTTCACGCAGGGTACGGTCTCT
 GGCGGTAGGTCAATTACCGCGTAATAGCTCGGAAATTCGAGAGTGATCA
 GCCAGCCATCGAGACCTTTGGCCTGGGCGGGCGGGCCATTTGCGCCTT
 GGCCGAATCGGTTCAGGCCGCGGAGGGTGGCTTCGTCTGCTGACGTGCCG
 GGTCCAGGCCTGGGTAGCGTCCAGCAACTGGTTGGAGAATTTGCTGCC
 CAGCTCCGACAGCTTGTCTTGCACCTTCGGCGTAGCGCTTCTGCTGCTCG
 GGCGGCAAAATCGATAACCCGACAGGCGGAAGTCGCGCAGGGCGTGTTC
 AGGATGGTTTTTTTGGCGCCACATCGAAACCAGCGGCCTCCGGGCTGTTGG
 CCAGGGCTTTCGAAGGCCTGGAACAGTTCACGGTTCTGCCCATCTCGGT
 GGAATAGGCGCTCAATGCCGGCAGGACAGCCTCATAGGCTTCGCCAG
 CTCGGCGCTGTTACACACCGCATTGAGGTGGCTGACAGGGCTCCGAGCC
 GCGCCGAGGCGATCGTTGAGCTCGTCCATGGCCAGGACCAGACCCGCC
 CATGTTCGGATTTTTTGGCCTTGGCTTTCAGGATGTCTGCGATCGCTGCAC
 GGTGTGTGGCCAGGATCTGTTTCGATGGCCGGCTGGACATGCTCGGCAC
 GGATCGCCGAGAACGGCGGCGAGGTCGTAGGGCTGCAGAAAGGGGTTGT
 TCGCGCTCACGGTTGGCACCTTGGCTGAAGAAACAGATAAAANAAAGA
 TGGGGGCCATCTTAATTACAATCAACACCCACCGCAGCTATCAGTACAA
 CAGAGAGAGGCTATCGTGACCCTTCGCACCTATCAGAATCACACGCCA
 ACCCTGGGCACCGGGGCTTTTGCATGTTTCNGCGNGGTGATCGGNGA
 TGTCGAATCGGCGCCGACNNTCGGTCTGGCCATTGACGGTATTCCG-3'

Ermittelte Sequenz von Mutante *P. fluorescens* Bk3 #1-15, Primer tpnRL13

5'NNCCCCCCCCGAGCTCTTAATTAAATTTAAATCTAGAGTTCGACCTGCAG
 GCATGCAAGCTTCAGGGTTGAGATGTGTATAAGAGACAGAGTCTACGC
 GGCCTACTGCACCCGCGCGCTCGGACCAGGGCCCCGAATGCCGGTTCAGAA
 CGATAACGGCCCCGGTGATGGAACAGATCCTCGACTTGCCTCAGGAACT
 GGCTCAATTGCTGGGCTACGCGTCTGTTTGGCCGAAGTGAAGCTGGCCACT
 AAAATGGCCGAGTCGAGCGATCAGGTGCTGAGTTTCTGCGCGACCTG
 GCCCCGGCGCAGCAAGCCGTTTCGCGACCCAGGACCTGCAGCAGCTCAAG
 GCCTACGCCGCCGAACAAGGTTGTGCCGACCTGCAAAAGTTGGGACAGC
 GGTTTCTACGGCGAAAACTGCGCGAGCAGCAGCTACAGCTGTGTCCAG
 GAAGCCCTGCGCGCCTACTTCCCAGATCGACAAGGTGCTGGGCGGCCCTG
 TTCGCCATTGTGTCAGCGCCTGTATGGCATCGAAATCGCCGAGCAGAAA
 GGTTTTCGACGCCTGGCACCCGGACGTGCGCCTGTTTCGAGATCAAGGAA
 AACGGCCAGCACGTGCGGCCCTTCTTTGACTTGTATGCCCCGCCCA
 ACAAGCGTGGCGGTGCTGATGGACGCGCCGCGACCCGCCGCCCA
 CCGTTCGATGGCGGTGCTGCAAAAGCCCGGTGGCCAAACCTGGTGTGCAACT
 TCACCCCGGCCGACAGTGGCAAGCCTGCCCTGCTGACCCACGATGAAG
 TCACCAACCTGTTCCACGAATTTCGGCCATGGCCTGCACCCACCTGTTGAC
 CTGCGTTGAACACGCGCGGTATCCGGTATCAACGGCGTCTGCTGGGAT
 GCGGTGGAGTTGCCGAGCCAGTTTTCATGGAGAACTGGTGTGCTGGGAGCC
 TGAAGGCCTGGCGCTGATTTCCGGTTCATTACGAAACCGGTGAACCGTT
 GCCCCACGACCTGCTGGAAAAATGCTCNCGGCGTGAATTTCCAGTCCG
 GS CNTGATGATGNGCGNCAGCTGGAGTTCTCGNNGTTCGACTGCTG
 NCGCCNCCNACGGNTACGGTNNCATGTGGCGCAGGTNTNGGAAGGGTT
 NCTNATNAGTCTCG-3'

Ermittelte Sequenz von Mutante *P. fluorescens* Bk3 #8-15, Primer tpnRL17

5'ACTTAGACCCTCTCAAGCAATTTTGAGTGACACAGGAACACTTAACG
GCTGACATGGGGGGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATGGTTGAGA
TGTGTATAAGAGACAGGTCGAAGACTTCGACGCCCTGATCATGTTTCGT
GCGCACCAAGCAAGCGACCCCTGGACCTGGCCAGCGCCCTGGAAGCCAA
AGGCTACAAGGCCGCTGCGCTGAACGGTGACATCGCCCAGAACCCAGCG
TGAGCGCGTCATCGACTCCCTCAAGGATGGCCGCCCTGGACATCGTTGTG
GCGACCGACGTTGCTGCCCGTGGTCTCGACGTTCCACGTATCACCCACG
TGTTCAACGTTGACATGCCGTACGATCCTGAATCCTACGTTCAACCGTAT
CGGCCGTACCGGCCGTGCCGGTTCGCGAAGGTTCGTGCACTGCTGCTGGT
GACGCCACGTGAGCGCCGCATGCTGCAAGTGATCGAGCGTGTGACCCGG
GCAGAAAGTTGCCGAAGTGCGCCCTGCCGGATGCCCAGGCTGTTCTCGA
TGCTCGCATCAAGAAATTGACCAACAGCCTGGCACCCCTTGGTGGCTGA
CGCTGAATCGAACCCACGGCGACCTGACCGCCTGACCGCCGATAT
CGGTTGCAACCCCGCGTGCCCTGGCTGCGGCGTTGCTGCGCAAAGCCAC
CAACGGTCAAGCCCTGACCCCTGGCGGGCCATCGAGAAAGGAACGCCCACT
GGTGCCGAACAACGCGCCACGCGGTGATCGTCCAGAGCGTACCGGCCGA
CCGTCCGGAGACGAGNNTGGAAAACCTGCTGGCAAGTTGAAGAYACTCNT
GAAGGTTCGTGCTCGTTGCCGTACCGCGCTGGGCGCGCGTGACGGTATC
GCGGCTAAGAACCTGCTGGGCGCTATCCTCAACGAGGGTGGCCTGGCA
CGTGAAGCCATCGGTTCGCATCCAGGTGCGTGACAGCTTCTCCCTGGTGG
AGCTGCCGGAGACGNNNTGGAAAACCTGCTGGCAAGTTGAAGAYACTCNT
GTTGCCGTANGNNTGAAGNNTGNGNNTCNCGAANATGATCCGCGCTCC
AGGNTGATTGATCNACNTAAAAAATCCGACTGTTCCGGGATTTTTTGCCT
GGGATTNGGCNNGNCTCGTNTGGGGAAAGTANTGNATANNCAANTATA
GNATCNAT-3'

Ermittelte Sequenz von Mutante *P. fluorescens* Bk3 #8-15, Primer tpnRL13

5'CGCCCCCCCCCGAGCTCTTAATTAATTTAAATCTAGAGTCGACCTGCA
GGCATGCAAGCTTCAGGGTTGAGATGTGTATAAGAGACAGGTCTTCGA
CTTCCAGCAGGCTCAATACAGCCGAGGTCTTCTGGTCAGCGTGAACCA
ACAGGTGAGCCTGTTTCGATCGCGGTAAACGGTCTGGGTCTTGGTCTGGAT
CTTGACGTGTTGCGGATCGCGCAGATGGCGTTTCGGCAATGGCACGGAT
CGACTGCGGCAGGGTGGCCGAGAACAGCAGGTCTGACGGGTCCGGTGG
CAGTGCCCTTGAAGATGACTTCCAGGTTCGTCATGAAGCCAGTTTCAAC
ATTTTCGTGCGCTTTCGTCCAGAACCAGGTGGTTTCACGGTCGACAGGACTT
TCTCGTCACGACGCGAGGTGGTTCGCACAGACGGCCCGGGGTGGCGACAA
CGATCTGTGCGCGTTACGGATGGCTTTTCAAGTTGTGGGCCCATTGGGCGC
GCCGCGTAAACCGGCCACAAACGGTTACACCTGGCATTTGCTGGCGTA
GGTTTTCGAAAGCGGTTGCTACTTGCAGCGCCAACTCACGGGTTGGCGC
CAGGATCAGGGCTTTCGCGCTTCGCGCTTGGCAGGATCGATGCAAGTGCAG
GATAAGGCAGGGCGAACGCGGCGGTTTACCAGGTACCGGTTTGCGCCTG
GCCAATCATGTTCCCTGGCCGGCCATGATGATCGGGATCGATTGCTGTGA
ATAGCCGAAGGTTCTTTCGTAGCCAGTTCGCGATGACAGCGGCGAGAAATG
TTCGGATTAAAGATTAAAGCGGCGAAGCCGCCGTTTCTTGGGTTCATG
GGTCTGCCTCTAAGTGCATCCGCAAGACCCATGCTCCAAAGCTGCGC
ATGCCGTGTTGAGACTCAAGAGTCCGCTGGCTGCTTTGTGCGCGGGG
ATTTGCNAAACGATTGAATGAATAAGATTCTCATGGGAGWGTCCGCTG
TGTGGACNTGCANCCAAAGNTNACTCTGTGAATTGCGCTACNTANCNCG
GCCGGTTAATGCCGNNSCNGNCTNTNCCGAATANCTGAAAAGGNSNTTTT
TTNTCGC-3'

Ermittelte Sequenz von Mutante *P. fluorescens* Bk3 #8-28, Primer tpnRL17

5'AACTTAGAGCCTCTCAAGCAATTTTGAGTGACACAGGAACACTTAAC
GGCTGACATGGGGGGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATGGTTGAG
ATGTGTATAAGAGACAGGATCGAAACCATGCGTCGCGAAGGCTTTCGAA
ATGGGTGTTGGTTCGTCCGGAAGTGATCATCCGTCAGGTTGACGGCGTG
AAGCAGGAACCGTTTCGAAAACGTCAACCATCGACACCCCTGAAGAATCC
CAGGGCAAGGTCATGGAAAGAGATGGGCCTGCGTAAGGGCGACCTGACC
AACATGGTGCCGGATGGCAAAGGCCGTGTACGTCTGGAATACAACATC
CCTGCGCGTGGTCTGATCGGTTTCCGTAACCAAGTTCCTGACCCTGACCA
ACGGTGTGCTGGCATCCTGACCTCGATCTTCGATCGCTACGACACCATGAA
GTCCGGCGACATGTCCGGTTCGTAGAACACGGTGTTCGTTCTGGGTAGAA
AACCGGCAAGGCGCTGACCTACTCCCTGGAAACTCTCCAGGCGCGTGG
CAAGCTGTTTCGTTGAACACGGTCAAGAGATCTTCGACCTGTTTCGACAAC
CTCGGCGCTACCGAAGAACAACTGGATTTCCAGGTTATCTACGCCCTCGG
CCCTGAACCGGATTTGCCGGTCTTGGAACACACCGCCATCGGCTGAAGACA
TGACCCCGCTGTACCAGGCCATCGTTGACCACGTTCCACCACCGAAGGT
TGATCGTGACGGTCCGTTCCAGATGCAAATCTCGGCACTGGACTACAA
CAGCTTCCTGGGTGTTATCGGCGTTGGTTCGTATCGCGCGTGGCAGCGTC

AAGCCGAACACCCCCGGTTGTTGCCATCGGGCGCCGACGGCAAGAAGCG
 CAACGGTTCGTATCCTGAAGCTGATGGGTCAACACGGCCTGCACCGTAT
 CGACGTTGAAGAAGCCTTCGCCGGCGACATCGTGTGCGTCAGCGGTAT
 GGA CTGCTGTTTCATCTTCCGACACCCCTGTGCCAGCCGGACACCGTTCGA
 GGC GATGAGCNCTGACCGTTCGACGAGCCACCNGTTTTCATGNCTTCCAG
 GTAACGACTCGCCGTTCTGCGGTAGGAAGGCAGTTCTGTGACCTCCCGT
 AACATCAAGGAGCGTCTGGANAAGAGCTGCTNACACNTTGCCCTGNCG
 GTGAAAAGNNANNNNCCGANAGTTCAGTNNCGNC-3'

Ermittelte Sequenz von Mutante *P. fluorescens* Bk3 #8-28, Primer tpnRL13

5'CGCCCCCCCCCGAGCTCTTAATTAATTTAAATCTAGAGTCGACCTGC
 AGGCATGCAAGCTTCAGGGTTGAGATGTGTATAAGAGACAGGTTTTCGA
 TCAGTACCGAGAGGTGTCAGCTCACACGGCCGGAGACCTTGAACCTTGT
 CGCCGAGTTCGCTTCTTCAACGCGCAGGGCAACGTTGTACAGCAGCT
 CTTTGTCCAGACGCTCCTTGATGTTACGGGAGGTCACGAACCTTGCCTTC
 CTTACCGCAGAACGCGCAGTTCGTTTACCTGGAAGGTCATGGAAACGGT
 TGGCTCGTCGACGGTTCAGAGGCTTCATCGCCTCGACGGTGTCCGGCTGG
 CACAGGGTGTGCGAGATGAACAGCAGAGTCCATACCGCTGACGCACACG
 ATGTGCGCCGCGAAGGCTTCTTCAACGTCGATACGGTGCAGGCCGTGG
 TGACCCATCAGCTTCAGGATACGACCGTTGCGCTTCTTGCCGTCGCGCG
 CGATGGCAACAACCGGGGTGTTGCGCTTGACGCTGCCACGCGCGGATAC
 GACCAACGCCGATAACACCCAGGAAGCTGTTGTAGTCCAGTGCCGAGA
 TTTGCACTTGGAACGGACCGTCAACGATCAACCTTCGGTGTGGAACGT
 GGTCAACGATGGCCTGGTACAGCGGGGTTCATGTCTTCAGCCATGGCGG
 TGTGTTCCAGACCGGCAATGCCGTTTCAGGGCCGAGGCGTAGATAACCT
 GGAAATCCAGTTGTTCTTTCGGTAGCGCCGAGGTTGTGCAACAGGTTCGA
 AGATCTCTTGACCGTGTTCACGCAACGCTTGCCACGCGCGCTGGAGAG
 TTTCCAGGGAGTAGGTCAGCGCCTTGCCGGTTTCTACCGATACCAGAAC
 ACCGTTCTGACGACCGGACATGTCGCCCGGACTTCATGGTGTCTGAGCG
 ATCGAAGATCGAGGTTCAGGATGCCAGCACCGTTGGKYAGGGTTCAGGAA
 CTGGTTACGGAACCGATCAGACAGCGCAGGGGATGTTGTATTTCAGAC
 GTNNNCGGCTTTGCATCCGGCACCNCTGTGGTTCAGGTCGCCCTTACNNN
 GGCCCATCTCTTCATGACCTTGCCTGGGATNNTCAGGGTGTGATGNNN
 NCGTTTCGACGGTNCCTGCTTCNNNCGTTCACCTGACGGATGATNNCTCCG
 GACGACNACNCCATTTTCGAAGCTTGCGANN-3'

Ermittelte Sequenz von Mutante *P. fluorescens* Bk3 #13-17, Primer tpnRL17

5'ACTTAGAGCTCTCAAGCAATTTTGAGTGACACAGGAACACTTAACGG
 CTGACATGGGGGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATGGTTGAGAT
 GTGTATAAGAGACAGCTCCAGGGCCGCCGCTTCGATGTTGGCACCTTC
 AAACGGCTCGACGCGAAAGAAGTGGGTGTGGTCCGGGTACACGAACCC
 CTGCTCGTCCATGCCGATGGTTGTGTCGCGCAATTTCCAGCAACGCGTCG
 GTGGCGCAATTGAAACCGCGGTTTCTACGTCGATAACGACAGGCAAGG
 TAGCCGCGGAAACGCTCGGCCATCGGGTGACGCGAACCAGCCGCCACCG
 CTGTGTTCTCTGTTTCATCATCGTAATGGTCTTCACTCACTTGCTTTCCTCC
 AGCAGGCGCCAGCGCAGTGTTCACCGGCGCGCAGCGGGATAACGGTTC
 AACTCGCCAAAGGGCAGGCTGGCGGGGCGGTCCAGTCTTCACGAACC
 AGGGTGATGCGGTGCGGTATTGGCCGGCAGGCCATAGAAACGCGGGCCG
 TTGAGACTGGCGAAACCCCTCAAGCTTGTCCAGGGCATTGCGTTGTTTCGA
 ACGCTTACAGCGTACAGCTCGATGGCGGCAACGCGGTGTAGCAACCCG
 CGCAACCGCAGGCGGCTTCTGCGCTGGCGTGGGCGTGGGCGCGGAAT
 CGGTGCCGAGGAAGAATTTCGGGCTGCCGCTGGTTCGCGGCGTCCAGCA
 AGGCCACCTGGTGGGTGTTGCGCTTGAGGATCGGCAGGCAATAGAAAGT
 GCGGCCGAATCCCGCCCAACACATGTGGTTGCGGTTGTACAAACAGGT
 GGTGTGCCGCGATGGTTCGCGCCAACNTTGGNCGAANCCTCNGTGACGA
 ACTNGCNNGCGTCGNNGGGTGATGTGTTCAACACCWCCNTGAGGGTNG
 GGAACA-3'

Ermittelte Sequenz von Mutante *P. fluorescens* Bk3 #13-17, Primer tpnRL13

5'CCCCCCCCCGAGCTCTTAATTAATTTAAATCTAGAGTCGACCTGCAGG
 CATGCAAGCTTCAGGGTTGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCCTGGAGT
 TCACCGGCATCAAGCTCGATCACCCGCTGCGCATGGCGGTGAGTGAAG
 AAGCCGCGCTGACCGACATCTTCCGTGGCGTGCAGAGCGCTGAAGG
 CCAATGGCTGCAAGCGTGCATCTGGTGGGGCAACAACGAGTTTTCG
 ACCTGGGCTTCTCAACGCCGCCGTGGCGCGGCTGGACATGAAACGCA
 ACCCGTTTTCATCCGTTCTCCAGTTTCGACACCGCCACGCTCGCCGGCCT
 GGCTATTGGTCAGACCGGTGGCGTGGCGAAGCCCTGCCAGGCAAGCGGTAT
 CGACTTTCGACGCGCGGAGCTCATTCGGCCGCTACGACACCGAGAA
 GACCGCCGAGCTGTTCTGCGGCATCGTCAATCGATGGAAACAGATGGG
 CGGCTGGGAAGACTTCGGCGACTGAGACTCCCCGCCCATAAAAAACCC

GGCCTTCTCAGGCCGGTTTTTTTTCTACCTTGAATCCGGGCTTACAGCTTG
 CCGGCGTTCTCGGTCAAGTAAGCCGCCACACCTTCGGTGGAAGCGGTC
 ATGCCCTTTGTCGCCCTTTCTTCCAGTTGGCAGGGCAGACTTTCGCCGTGC
 TCTTCGTGGAATTGTCAGCGCGTCGACCAGGCGAATCAGCTCTTCCATGT
 TACGGCCCCAGCGGCAGGTCGTTGATGATCTGCGAGCGCACAAACGCCCT
 TGTCTGTCGATCAGGAACGCGGCCACGGAAAGCCACACCGCCTTCGGATT
 CGACGTCTGACGCCCTTGGCGATATCGTGCTTCATATCGGCAGCCATGGT
 GATTTTGTACTTTWCCGATGCCGCCATCGTTGATGGCCGTGTTGCGCCNG
 GCATTGTGGGTGAANGGGAGCCNATGGAAACGGNNACCANTTCAC-3'

Ermittelte Sequenz von Mutante *P. fluorescens* Bk3 #16-22, Primer tpnRL17

5'NACCTTAGAGCTCTCAAGCAATTTTGAGTGACACAGGAACACTTAAC
 GGCTGACATGGGGGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATGGTTGAG
 ATGTGTATAAGAGACAGGATCGAAGAAGTCAGCGAAGCCCTGGCCGGC
 CAGATCATCGTTCGACATCCGTACCCGGATGCCGCCGAAGACGAGCCG
 CTGGAGATTTCCTGGCGTCGACGTACAAACGCTGCCGTTTTATGCATTGA
 ACGCGCGTTTTCAAGGAACTGGATGACAGCCGTCAGTACCTGCTGTATT
 GCGACAAAGGCGTGATGAGTCGCCCTGCATGCCACCACTTTGCTCAGTG
 AGGACATGCCAATGTGCGCGTTTTATCGACCGAGCTAAGAGCCCGGG
 CTGTTTTGCCCTGTGGCCTGCGTCACCGGCCCCCCGACTCTGCCGTCAAGC
 TGTAACGGCAAGGCCTGACTCTACTGTTAATCGCTGCCACGACCTGTCA
 GCACACCGAATCCTCTGATCGAGATACACAAGTGATCGAAAATCTACG
 TAACATCGCCATCATTTGCTCACGTTGACCATGGTAAACACCCCTGGTA
 GACAAACTCCTGCGTCAATCCGGGCACCCCTGGAGCGCAACGAGCTCAAC
 GACGAGCGCGTGATGGACTCCAACGACCAAGGAAAAAGAGCGCGGTATT
 ACCATCCTGGCGAAAAACACCGCCATCAACTGGAACGGCTACCAACATC
 AACATCGTGACACCCCGGGCCACGCGCGACTTCGGCGGGCGAAGTTGAA
 CGCGTAATGTCTGATGGTCGACTCCGTTCTGCTGCTGGTTGACGCTCAAG
 ACGGCCCTWTGCCGCAAACCCGTTTTCTGTGACCAAGAAGGNGTTTCAAG
 CCGGCCTGCGTYCGATCGTGTGCATCACAAAGGTTGACCGTCCAGGCNC
 GCGNCCGGAAGTGGGTTCTGGNCGNATCTGATGCAGGATGACCGGGATC
 GCCAGGAACAGMCNCTCATGTCTCAGNTTCWNNGCNNGNANGCNGG
 NGACTACCCTNGTNGNANNATCGTTCGCGCCGGCCGGNAGTACTGGCN
 NANNNGTGANNCGANGTATAGANNTGNNCNGCANCCGCCNTNYGNTGT
 NGCANACTGTTTCGNCNNGANNGCGNCGGNANNCNNCNCNCTNNCNCNCT
 AACCTTAAGACNCANGNTAAGNAGGATNTNN-3'

Ermittelte Sequenz von Mutante *P. fluorescens* Bk3 #16-22, Primer tpnRL13

5'NCGCCCCCCCCCGAGCTCTTAATTAATTTAAATCTAGAGTCGACCTGC
 AGGCATGCAAGCTTCAGGGTTGAGATGTGTATAAGAGACAGTCTTCGA
 TCTGCACATCCTGGCCCCAGCTCGTTCGATGACGCGATCGATCGGGACCA
 GTTTGGCGTTCTCGAGCGCACGCTCCAGAATCGCCATGTGCAACTGTTG
 TTCTTCATACTCCACGCGGTTGCGCTTGGCGTGGGTCTTGGGGTTTACC
 GAAATGACCCCCGCAATACTCGGGCATATGCTTGGCAAAAGTCGGCGGTG
 CCGATTTCTTCTGCCAGGTCGATGATGTCCTGCTTGTGGCTGGCGATCA
 GCGGGCGCAGCACCAAGCTTCTCGGTACGCGAGTCGATCAACGACAGGT
 TCGGCAACGTCTGGCTGGACACCTGGGAGATCGCCTCACCGGTCAACCA
 GCGCATCGATCTGCAACTGGTTCGGCGATCCGGGACGCGAGCGCGCAACA
 TCATACGCTTCAATAACACGCCCATATGACTGTTATCGACTTTTGCCGAG
 AATTTTCGCCCAGCACTTCTCTCGAACGGCACGCTTACAAATAGCACGCGT
 TGGGAGCTGCCGTACTTCTTCCAGATAAAGTGCGCCACTTCCATCACGC
 CCAATTTCGTGTGCACGACCGCCCCAGGTTGAAGAAGCAGAAGTGGCTCA
 TCAGGCGCGCGCCGCGATGATCTGGTAGGCGCGACCGTGGAATCGAAAC
 CGCCGGACATCAACACCAGAGTCTGTTCCAGGGCGCCCCAGCGGGTAGC
 CGCCGATGCTGTCTGCTGGCTGTGGATCACAAAACAACCGTTGGTTCG
 CGAATTTCCATGCGCACTTCAATTTGCGGCGCTTTGAGGGAAATTCGG
 CGGCGCGCGCATTCGCGACGCGAGCTTGCTGCCGACGTATTCTCCACATCC
 NTGGAGCTGACGATGCTTGGCGGNGCGCTTGCACGCGACGAAAAATTC
 TTGCCGCAAGCTCACNTCGNAGTGCASCTTCNNNTCTCGGTGATGNCNG
 NAANCGCCAGCGGNACCTCGTCCACTGNNNGGAANGNCGNTNCCCGG
 CATGCAGCTNAGCGTCTCGGTCTATGTCTTCAGGNCTTTGGCGTCTGTC
 GNNGGTTTTCCNGTCNAGATNNCCCNCCNNNGTTCCNNCCNNNGCCGGGT
 CTGATNNNGGNACNGGNCGATGTT-3'

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass ich die Dissertation

**„Identifizierung der Wirkmechanismen von mikrobiellen Antagonisten von
Erwinia amylovora“**

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht bereits als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 12.04.2010

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Veröffentlichung

Flachowsky, H., Szankowski, I., Fischer, T. C., Richter, K., Peil, A., Höfer, M., Dörschel, C., **Schmoock, S.**, Gau, A. E., Halbwirth, H. und Hanke, M. V. (2010) Transgenic apple plants overexpressing the Lc gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight. *Planta* 231, 623-635

Geplante Veröffentlichungen

An Planta zur Ansicht eingereichte Arbeit:

Schmoock, S. und Gau, A. E. Autobioluminescent *E. amylovora* used for screening fire blight resistant *Malus domestica* cultivars and evaluation of biological fire blight control strategies.

Bislang uneingereichte Arbeiten:

Schmoock, S. und Gau, A. E.. Production of extracellular low and high molecular compounds with an inhibitory effect to *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight, by the antagonistic bacterial strains *Pseudomonas fluorescens* A506 and *P. fluorescens* Bk3.

Schmoock, S. und Gau, A. E.. Partial identification and analysis of low molecular weight substances involved in inhibition of *Erwinia amylovora* secreted by the non-pathogenic bacteria *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Pseudomonas fluorescens* Bk3

Tagungsbeiträge

Schmoock, S. und Gau, A. E. (2007) Distribution of *Erwinia amylovora* in susceptible and resistant *Malus domestica* cultivars and in presence of the bacterial antagonist *Pseudomonas fluorescens* Bk3. Posterbeitrag, Botanikertagung, Hamburg

Schmoock, S. und Gau, A. E. (2008) Identifizierung der Wirkmechanismen von mikrobiellen Antagonisten von *Erwinia amylovora*. Vortrag, 56. Deutsche Pflanzenschutztagung, Kiel

Schmoock, S., Kürkcüoglu, S. und Gau, A. E. (2008) Biological control of apple scab and fire blight by the application of the non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the leaf surface. Vortrag, Ecofruit - 13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing, Weinsberg

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Silvia Schmoock
Geburtsdatum: 27.02.1979
Familienstand: ledig
Anschrift: Mendelssohnstr. 9
30173 Hannover

Schulbildung

1999 Abitur
Luisengymnasium, Bergedorf

Berufsausbildung

1999-2001 Ausbildung zur staatlich geprüften Biologisch-technischen Assistentin
Gewerbeschule 13, Hamburg-Nettelburg

Studium

2001-2006 Biologie auf Diplom
Leibniz Universität Hannover

12.09.2003 Vordiplom
Genetik, Mikrobiologie, Chemie, Physik, Zoologie, Botanik

19.09.2006 Diplom
Genetik, Zell- und Entwicklungsbiologie, Phytomedizin

Thema der Diplomarbeit:
„Infektion und Ausbreitung des Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* in An- und Abwesenheit des bakteriellen Antagonisten *Pseudomonas fluorescens* Bk3 auf verschiedenen Apfelkultivaren“

2007-2010 Promotionsstudiengang Biologie
Leibniz Universität Hannover

2007-2010 Teilprojekt im Verbundvorhaben des BMELV zur Bekämpfung des Feuerbranderreger im Obstbau ohne Antibiotika:
„Identifizierung der Wirkmechanismen von mikrobiellen Antagonisten von *Erwinia amylovora*“

April 2010 Abgabe der Dissertation

30. Juni 2010 Disputation

Erklärung zum Verbundvorhaben

Die Förderung dieser Arbeit (Förderkennzeichen 06HS035) erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE).

Danksagung

Ich möchte sehr herzlich Herrn PD Dr. Achim E. Gau für die Überlassung dieses interessanten Themas danken, sowie seine ständige Gesprächsbereitschaft und die vielen hilfreichen Anregungen – es war eine tolle Zusammenarbeit!

Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Edgar Maiss, der sich bereit erklärt hat, Korreferent dieser Arbeit zu sein, sowie Herrn Prof. Bernd Huchzermeyer für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Beim Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes sowie die Möglichkeit, am „Verbundvorhaben zur Bekämpfung des Feuerbrandregers im Obstbau ohne Antibiotika“ teilgenommen haben zu dürfen.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Prof. William W. Metcalf, der mir das Plasmid pRL27 zur Verfügung stellte, Herrn Prof. C. Peter Wolk für die Bereitstellung des Plasmids pRL1406, Herrn Stefan Kunz für die Überlassung der Hefestämme *A. pullulans* CF10 und CF40, Herrn Prof. Jos M. Raaijmakers für die Unterstützung bei den HPLC-Analysen, Frau Prof. Virginia O. Stockwell für die Übersendung der Mutante *P. fluorescens* A506 AprX-, sowie Frau Prof. Linda Thomashow und Herrn Dr. Alejandro P. Rooney für die Zusendung der Bakterienstämme *P. fluorescens* 2-79 und *P. fluorescens* Pf-5.

Mein herzlicher Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Achim E. Gau sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Botanik und dem „Gärtnerteam“ – insbesondere aber Julia Lensing, Manjula Mundakana, Henrik Schumacher und Sophia Kürckcüoglu – vielen Dank für die vielen hilfreichen Gespräche, für skurrile Wetten, Kekse zur richtigen Zeit und den Spaß den wir hatten!

Ein lieber Dank an meine Freunde, die mich in dieser Zeit besonders unterstützt haben – Marianne Klokow, Heidi Duske und Mareike Derks, aber auch an die Hkler, Kuddewörder und Hannoveraner ;)

Unendlich dankbar bin ich meiner Familie Erika, Winfried und Martina Schmoock, sowie Dominik Geilker. Meinen Eltern Erika und Winfried, da ich ohne sie nicht das hätte werden können, was ich heute bin, und die mir ihre Liebe zur Natur weitergegeben haben, meiner Schwester Martina, die mir Gegenstück und Seelenverwandte zugleich ist- was wäre ich ohne sie?, und Dominik, der immer an mich glaubt, und bei dem ich zuhause bin.